Vol. 11 1940

# ARQUIVOS

DO

# INSTITUTO BIOLOGICO

VOLUME COMEMORATIVO DO 60.º ANIVERSARIO NATALICIO

DO

PROFESSOR DR. H. DA ROCHA LIMA





SECRETARIA DA AGRICULTURA

SÃO PAULO

BRASIL

*Por se ter verificado insuficiente para abranger todos os trabalhos apresentados o espaço disponivel no livro jubilar em preparo para comemorar o 60.º aniversario do Prof. Rocha Lima, tornou-se necessário fundí-lo com o numero 11 dos "Arquivos do Instituto Biologico" em um só volume jubilar, que fica porisso na seriação destes Arquivos.*

*Os trabalhos em lingua extrangeira oferecidos para aquele livro e agora intercalados na seriação alfabética dos demais trabalhos tem sua justificativa nessa fusão e no seu carater exclusivo de homenagem na forma usual universalmente adotada, o que torna impossivel apresentá-los em tradução sem aquiescência e colaboração dos autores, no momento praticamente impossivel de obter.*

*Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor do Instituto Biologico, Caixa Postal 2821, São Paulo, Brasil.*

---

*Because it has been verified that the available space in the jubilee book being prepared for the 60th. anniversary of Prof. Rocha Lima is not sufficient to include all of the papers that have been presented, we have found it necessary to change N.º 11 of "Arquivos do Instituto Biologico" into one jubilee volume that will be incorporated in the series of these Archives.*

*All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to-Diretor do Instituto Biologico, P. O. Box 2821 - São Paulo, Brazil.*

*With the Compliments* and thanks
*of the Librarian of*
*King's College London.*

STRAND,
W.C. 2.



Rocha Lima

Vol. 11 1940

# ARQUIVOS
DO
# INSTITUTO BIOLOGICO

VOLUME COMEMORATIVO DO 60.º ANIVERSARIO NATALICIO

DO

PROFESSOR DR. H. DA ROCHA LIMA



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

# SUMARIO



(CONTINÚA)

(CONTINÚA)

(CONTINÚA)

(CONTINÚA)

(CONTINÚA)

(CONTINÚA)

———o———

# HOMENAGEM

Festejando a data de 24 de Novembro de 1939, em que completou 60 anos o Professor Dr. HENRIQUE DA ROCHA LIMA, colaboradores, assistentes e amigos seus pediram-me um prefacio para êste livro jubilar, modesto presente de todos nós.

E' para mim não só uma honra, mas tambem motivo de grande júbilo corresponder a êsse pedido: honra, porque se trata de um homem fóra do comum, ao qual tributamos profunda admiração, júbilo, porque a ele me liga uma amizade de 37 anos, nascida no tempo em que tive a maior satisfação que um professor pode ter: o convivio de um aluno excepcionalmente talentoso. Nesse talento excepcional, RUBNER, ORTH, KAISERLING, DUERCK e eu, descobrimos logo um aluno predestinado, ao qual era pouco o que um professor poderia acrescentar. Dotado de uma viva capacidade de apreensão e de um agudo espírito de observação, ao qual nada escapava, mostrava ainda ROCHA LIMA uma assiduidade incansável e uma inabalável energia sempre que se tratava de encarar e resolver qualquer problema. Caraterisava-o, além disso um forte espírito crítico, aplicado em primeiro lugar às observações e experiências próprias, e que, no julgamento dos trabalhos de outros, discernia, com rara precisão os fatos novos bem verificados dos insuficientemente demonstrados. Dotado de fina habilidade manual acrescentava prazer estetico ao de observar-lhe no trabalho experimental o manejo da alça de platina, do microscópio, do micrótomo ou dos tubos de cultura.

Entre as qualidades principais a apreciar em ROCHA LIMA como pesquizador figuram o exato conhecimento de si próprio, o desejo constante de saber cada vez mais e o impeto com que procura a perfeição. Como biologista nato nunca perdeu de vista a complexidade das manifestações da vida, e nela, a engrenagem maravilhosa dos processos vitais.

Mal um problema parece desvendado, logo para o biologo se levanta novo enigma. Assim, numa época em que outros, com o seu saber, se teriam considerado maduros, foi ROCHA LIMA sempre de novo impelido para onde pudesse ainda aumentar os seus conhecimentos. Com pleno acêrto entreviu onde a medicina de sua jóvem pátria, que avançava a largos passos no caminho da investigação científica, ainda apresentava pontos fracos. E assim, ele, microbiologista, resolveu dedicar-se também à anatomia patológica no país em que, sobretudo por serem os problemas encarados do ponto de vista morfológico, a ciência médica se desenvolvera no mais alto gráo.

Lembro-me ainda da profunda impressão que lhe causaram as palavras com que um orador finalizou o seu discurso de saudação num congresso de Anatomia Patológica: *Hic locus est ubi mors gaudet succurrere vitae.* Esta verdade foi o seu lema e eis o segredo do seu exito: a feliz combinação da microbiologia com a anatomia patológica, de que resultaram as suas mais importantes realizações científicas, e que constituiu o sólido alicerce da grande obra que ele deveria realizar no domínio da ciência biológica pura e aplicada.

Na apreciação dos frutos de sua atividade impressiona-nos tanto a quantidade como a multiplicidade de seus trabalhos. Não que ele fosse dos que fazem questão do numero de publicações: o "multum". Isso era-lhe menos importante e em cada trabalho seu verificamos a profundeza peculiar aos grandes pesquizadores.

Ainda em pleno vigor de capacidade de trabalho, só uma época de sua vida aqui pudemos abranger, e nela apenas uma parte de sua obra: o cientista lança sementes que cedo ou tarde amadurecem sem que de antemão se lhes possa avaliar o futuro valor.

Todavia nesta fase da sua vida já é possivel ao homenageado volver os olhos com a maior satisfação e orgulho para uma série de realizações que trazem o cunho do perduravel.

Entre suas obras quero salientar principalmente duas: suas pesquizas no campo da febre amarela e do tifo exantemático com a criação das "Rickettsioses".

Os seus trabalhos fundamentais sobre a histopatologia do fígado na febre amarela, iniciados ha 34 anos, passaram durante muito tempo despercebidos, porém foram mais tarde unanimemente confirmados. Graças a êles é possivel, no cadaver, um diagnóstico seguro e uma exata diferenciação entre a febre amarela e outras moléstias que lesam o fígado. São porisso também de grande valor tanto para a epidemiologia como para a profilaxia dessa doença, permitindo uma verificação segura da sua ocorrência e oferecendo as bases para as medidas de combate.

E' interessante notar que ha 25 anos já ROCHA LIMA se referia a casos frustros de febre amarela e infecções amarilicas sem sintomas em que o paciente hospeda temporariamente o virus.

Foi ROCHA LIMA quem, em 1916, durante a guerra mundial, denunciou o agente causador do tifo exantemático, descrevendo-o em uma série de trabalhos fundamentais, sob o nome de *Rickettsia prowazeki.* Verificou que nos piolhos colhidos sobre doentes de tifo exantemático as rickettsias penetram nas celulas epiteliais do intestino e aí se multiplicam grandemente, provocando alterações caraterísticas. Fez estudos sôbre a capacidade infectante do sangue

dos doentes, sôbre a conservação e multiplicação do virus no corpo do piolho e sôbre sua filtrabilidade, sôbre a aglutinação das rickettsias pelo sôro dos doentes, bem como sôbre a imunisação ativa contra o tifo por meio do conteúdo intestinal de piolhos infectados. Com êsses trabalhos ROCHA LIMA não só esclareceu a etiologia do tifo exantemático, como tambem fomentou a epidemiologia e a profilaxia desse mal. Mais ainda: com a descrição da *Rickettsia prowazeki* criou um paradigma microbiológico para um novo gênero de microorganismos, abrindo assim novos rumos para a descoberta de uma série de outras rickettsias, agora com acerto e proveito reunidas em um só grupo. Este novo campo de pesquiza logo teve grande repercussão. Os trabalhos de ROCHA LIMA estimularam numerosos pesquizadores ao estudo das rickettsias, vindo muitos deles pedir-lhe orientação e tornando-se mundialmente reconhecida a sua autoridade no assunto. No campo das pesquizas sôbre tifo exantemático e rickettsias, qualquer que seja o capítulo que se abra na literatura mundial, sempre a atividade do pesquizador ROCHA LIMA é salientada como fundamental. Em 1917 ele proprio descreveu a *Rickettsia pediculi*, identificando-a como o agente causal da febre das trincheiras e distinguindo-a da *Rickettsia prowazeki*, causadora do tifo exantemático. Não esqueçamos que justamente nessas pesquizas sôbre o tifo exantemático a técnica de ROCHA LIMA é sempre brilhante: vejam-se as excelentes figuras de suas publicações sôbre o assunto e as descrições de seus minuciosos métodos.

Seus estudos sôbre piolhos levaram-no tambem a demonstrar experimentalmente a possibilidade da transmissão da febre recurrente ao homem, pela picada desse parasita.

Belos exemplos da fecundidade de seus métodos de pesquiza, pelo magistral domínio da microbiologia e da anatomia patológica, são fornecidos igualmente pelos seus trabalhos sôbre a verruga peruana e a blastomicose.

Na verruga peruana ROCHA LIMA firmou definitivamente o quadro histopatológico das alterações especificas e encontrou a forma intracelular do virus. Na blastomicose demonstrou, como microbiologista, que o agente etiológico era um cogumelo blastomicêto e não um protozoário como fora descrito por DARLING sob o nome de *Histoplasma*, e como anatomo-patologista estabeleceu as bases para a classificação histológica dos varios tipos de blastomicoses.

Ao pesquizador ROCHA LIMA foi de grande utilidade a sua capacidade de expôr com clareza plastica os resultados de suas investigações; sua palavra, quer falada quer escrita, é expressiva e perfeitamente modelada. E' ele apreciado na literatura como excelente sintetisador, razão pela qual suas brilhantes contribuições e monografias

consideradas como modelares figuram nas mais importantes enciclopédias da Biologia, da Medicina Tropical, da Medicina Interna, da Dermatologia, etc. Por outro lado, também como conferencista e professor, ROCHA LIMA sempre soube conquistar auditorio e alunos. Por esse seu dom de mestre já era conhecido e apreciado no Instituto de Manguinhos e também mais tarde na Universidade de Hamburgo, sobretudo no "Tropen-Institut" dessa mesma cidade, onde não só como cientista mas ainda como professor, desenvolveu intensa atividade, sendo contado entre os mais firmes esteios desta instituição de renome mundial. Também com essa sua atividade colheu ele grandes honras para a sua patria e não só na Alemanha mas em todo o mundo, pois ao Instituto de Hamburgo afluiam médicos, veterinários e zoólogos de quasi todos os países afim de se aperfeiçoarem em medicina tropical.

Aliás foi primeiramente por intermédio de ROCHA LIMA que se tornaram conhecidos no velho mundo os progressos da microbiologia e das ciências medicas brasileiras. Quem na Europa conhecia então, no primeiro decênio dêsse século, os grandes feitos de um Oswaldo Cruz e os trabalhos científicos produzidos em Manguinhos? Para mim foi motivo de constrangimento o nunca ter tido conhecimento desses progressos através da literatura européa e pela primeira vês ser inteirado deles por intermédio de ROCHA LIMA, que continuou a realizar um exuberante trabalho de divulgação da ciência brasileira. A ele se deve o comparecimento do Instituto de Manguinhos ao Congresso Internacional de Higiêne de 1907 em Berlim, onde aquele instituto brilhou por uma impressionante exposição das suas atividades, dando uma idéa exata do novo centro de pesquizas científicas do Brasil aos higienistas e bacteriologistas chegados de toda parte.

As aptidões de ROCHA LIMA vão porém muito além do que produziu como pesquizador e professor. Ele reune também todas as qualidades de um *grande organisador*. Somente um homem de profundo saber, grande variedade de conhecimentos, inteligência clara e larga visão, um homem profundo conhecedor de homens, dotado de grandes virtudes humanas e especial capacidade de organisar, poderia abordar e resolver as questões que lhe foram confiadas como Diretor do Instituto Biologico de S. Paulo. Tempo virá em que a sua obra inclusive o trabalho de detalhe dela, como diretor deste instituto, melhor poderá ser avaliado. Já hoje porém são evidentes os efeitos de sua inconteste aptidão construtiva e coordenadora de grande alcance. Ele soube, em um prazo relativamente curto, elevar o Instituto Biologico à posição de um centro de ciência mundialmente reconhecido, onde os mais variados problemas são estudados com rigor científico (leiam-se os substanciosos "Arquivos do Instituto Biologico") e onde se formam

novas gerações de cientistas. A propósito devemos lembrar as conferências semanais por ele creadas e brilhantemente dirigidas, que pela sua variedade não encontram cousa igual no mundo e que se tornaram o ponto de reunião de todos quantos entre nós cultivam algum ramo da Biologia. Quanta inspiração não tem nascido dessas horas tão pouco conhecidas do publico!

Mas este instituto não é cercado pelas muralhas de um claustro; nele a ciência vai ao encontro das necessidades da vida para levar à coletividade proveito e socorro. Não é a mim que compete enumerar o que a agricultura, especialmente no que se refere ao combate às moléstias dos animais e vegetais, deve a ele e a seus colaboradores. Da mesma maneira que as anteriores pesquizas de ROCHA LIMA redundaram, como já mencionamos, em grande beneficio para a humanidade, também na orientação que imprime ao Instituto Biologico, ele sempre sabe beneficiar a prática com a aplicação das conquistas científicas. Os numerosos artigos de divulgação publicados sob sua orientação, sobretudo na extremamente util e ilustrativa revista "O Biologico" (especialmente o n.º 1 do 5.º ano dessa revista, o artigo intitulado "Mais um ano"), dão uma idéa de sua capacidade de organisação, bem como do vulto do seu trabalho no domínio da aplicação da ciência à pratica, e mostram o grande beneficio que o Instituto Biologico presta e prestará ao Brasil.

Feliz o país cujos dirigentes têm a compreensão exata da importancia de tais instituições científicas ao serviço das necessidades praticas; feliz o país possuidor de homens com as qualidades de um ROCHA LIMA; feliz também a própria personalidade que com seus conhecimentos e aptidões consegue ampliar em grande escala a gloria e o bem estar da patria.

E a pessôa de ROCHA LIMA? Para que analisá-la? Ele está vivo entre nós e todos vemos e sabemos que quantos o conheceram e conhecem, sejam superiores, mestres, colaboradores, assistentes ou alunos, todos se tornam seus leais amigos. Reunimo-nos em torno dele profundamente gratos por tudo o que nos deu, desejando-lhe sinceramente e com profunda veneração

a d   m u l t o s   a n n o s !

*Martin Ficker*

---o---

# TRAÇOS BIOGRÁFICOS DO PROFESSOR ROCHA LIMA

Filho de um dos mais notaveis clinicos do Rio de Janeiro, HENRIQUE DA ROCHA LIMA, nasceu nessa mesma cidade e aí fez todos os seus estudos até a sua formatura na Faculdade de Medicina, que, na falta de uma faculdade de ciencias, era onde no Brasil melhor se adquiriam as noções elementares da biologia.

Embora doutor em medicina, ROCHA LIMA nunca exerceu a profissão, tendo-se dedicado desde o inicio de sua vida profissional a estudos de biologia aplicada e especialisando-se na investigação das causas e lesões das doenças infectuosas dos homens e dos animais, sobre o que publicou numerosos trabalhos, com os quais conquistou o renome de que goza no mundo cientifico.

ROCHA LIMA frequentou ainda como estudante o Instituto de Manguinhos que se achava então em sua fase inicial, seguindo depois para Berlim após a sua formatura. Aí dedicou-se principalmente ao estudo da microbiologia no Instituto de Higiene, com o Prof. M. FICKER como seu mestre; e no Instituto Patológico da Universidade iniciou a sua especialisação em anatomia patológica, guiado pelos Professores KAISERLING e ORTH.

Voltou para o Brasil justamente quando OSVALDO CRUZ acabava de ser nomeado diretor da Saúde Pública. Este convidou-o para colaborar na obra de Manguinhos e na primeira reorganização do Instituto creou para ROCHA LIMA um dos dois unicos postos de chefe de serviço. Aí, enquanto a atenção de OSVALDO CRUZ era desviada para a organização do combate à febre amarela e o preparo de sôros e vacinas constituia a principal incumbencia do outro que era chefe de serviço, tomou a si ROCHA LIMA a orientação cientifica dos jovens microbiologistas, que mais tarde se tornaram grandes expoentes da ciencia brasileira. Para os alicerces cientificos da obra imorredoura de OSVALDO CRUZ poucos contribuiram tanto como ROCHA LIMA. Embora ainda muito moço, era êle o constante examinador nos concursos instituidos por OSVALDO CRUZ para a escolha de medicos para a Diretoria de Saúde Pública. Os primeiros cursos de microbiologia do Instituto Osvaldo Cruz foram organisados e lecionados por ROCHA LIMA, que também realizava então cursos de anatomia patologica para clinicos. Datam dessa época as primeiras pesquizas que deram assunto para téses de doutorandos, sobre bacteriologia e imunologia.

Após seis anos (1903-1909), dedicados a essa escola de pesquiza cientifica iniciada por OSVALDO CRUZ, os quais foram apenas interrompidos por uma viagem de estudos à Alemanha, onde no Instituto Anatomo-Patológico de Munich foi discipulo do Prof. H. DUERCK, exonerou-se ROCHA LIMA do seu cargo em Manguinhos, voltando para a Alemanha, onde a convite de seu mestre, Prof. H. DUERCK, que passara a catedratico da Universidade de Jena, assumiu o cargo de assistente chefe do Instituto de Anatomia Patológica dessa Universidade. Ocupou esse cargo durante 8 meses, exonerando-se para aceitar o convite do Prof. PROWAZEK para ir fazer parte do corpo de cientistas do celebre Instituto de Molestias Tropicais de Hamburgo, no qual colaborou de 1910 a 1928, quando regressou ao Brasil.

No Instituto de Hamburgo, onde entrou como assistente, foi-lhe depois confiada a direção de uma nova secção de patologia e virus, para êle especialmente creada. Em 1919 realizou ROCHA LIMA a sua lição inaugural como docente livre da Universidade de Hamburgo, após lhe ter sido concedida a regalia da dispensa de qualquer exame ou formalidade para o reconhecimento do seu diploma brasileiro. Em seguida recebeu o titulo de professor, lecionando tanto nos cursos de especialisação para medicos na Escola de Medicina Tropical, como em cursos universitarios. Ao lado disso realizava cursos sobre os mesmos assuntos em português, para medicos sul-americanos.

Como professor no curso de Medicina Tropical do Instituto de Hamburgo, conta ROCHA LIMA numerosos discipulos em quasi todos os países do mundo. Seus laboratorios eram frequentados por grande numero de estudiosos, entre êles muitos especialistas de renome tanto da propria Alemanha como da America do Norte, Italia, Russia, Japão, China, India, America Central e do Sul, que vinham acompanhar suas pesquizas, examinar os seus preparados originais ou estudar a documentação de suas descobertas.

Os primeiros trabalhos cientificos de ROCHA LIMA giravam em torno do problema das lesões organicas na Febre Amarela e sua aplicação ao diagnostico post-mortem da doença, investigações que o levaram a estabelecer o quadro histopatologico caracteristico da doença, também chamada "lesão de Rocha Lima", para cuja alta importancia pratica no reconhecimento e epidemologia dessa molestia, apezar de suas publicações em 1911 e 1912, só muitos anos mais tarde se voltou afinal a atenção dos meios medicos; as ideias e observações de ROCHA LIMA foram então amplamente confirmadas e são até hoje aplicadas na pratica. No periodo inicial desses estudos ocupou-se também com o diagnostico microbiologico da peste bubonica humana e da peste da manqueira dos bezerros.

O segundo sucesso cientifico de maior vulto em sua carreira, obteve ROCHA LIMA investigando a histopatologia das lesões da Verruga peruana ou Doença de Carrion. Essas pesquizas deram-lhe a primasia no reconhecimento da natureza e origem das lesões caracteristicas da doença e levaram-no a descobrir a forma intracelular do virus causador dela. Também estes trabalhos foram depois amplamente confirmados por outros pesquizadores, entre êles Dr. MAYER, na Alemanha, NOGUCHI, na America do Norte, e CUNHA e MUNIZ, no Brasil.

Em 1914 foi incumbido pelo governo de Hamburgo para em Constantinopla estudar uma epidemia de tifo exantemático irrompida nas tropas turcas de volta da ultima guerra balcanica. Esses trabalhos, associados a preleções que juntamente com o Prof. PROWAZEK fazia no Hospital de Haidar Pascha, foram interrompidos pelos acontecimentos que vieram desencadear a guerra mundial.

De volta a Hamburgo, encarregou-se no inicio da grande guerra, no Instituto de Hamburgo, dos exames bacteriologicos para o primeiro hospital militar improvisado nessa cidade. Pouco depois foi contratado pelo governo alemão para investigar durante a guerra a causa do tifo exantemático, que havia irrompido nos grandes campos de prisioneiros russos vindos da batalha de Tannemberg, objetivo que depois foi ampliado no sentido da investigação também de outras molestias exoticas ou pouco conhecidas, que ameaçavam os exercitos em campanha.

Como todos os medicos que então penetraram nesses campos de prisioneiros assolados pela febre petequial, foi o Prof. ROCHA LIMA juntamente com o seu companheiro, o celebre Prof. VON PROWAZEK, acometido do terrivel mal, do qual foi nessa ocasião o unico a escapar com vida. Essa perigosa missão valeu-lhe a condecoração com a cruz de ferro conferida pelo imperador da Alemanha.

Ainda mal restabelecido, reiniciou as suas investigações, que tiveram como resultado a descoberta do microbio do Tifo exantemático sob a forma da *Rickettsia prowazeki* e a creação de um novo genero de microorganismos patogenos, com o que abriu um novo capitulo no dominio da microbiologia e da patologia, o das "Rickettsias" e das "Rickettsioses. Desses novos microbios já são conhecidas numerosas especies, entre elas as causadoras da febre petequial das montanhas rochosas, da febre das trincheiras, da "heartwater" e do Tifo exantemático de S. Paulo. Êsses trabalhos do Prof. ROCHA LIMA foram depois, sem exceção, confirmados pelos pesquizadores de todos os países.

Durante toda a guerra mundial continuou ROCHA LIMA a aprofundar as suas investigações sobre essas molestias de maxima impor-

tancia para os exercitos em campanha como para a população civil e sobre a qual se concentravam os esforços e a atenção de todo o mundo medico. A isso deve sem duvida ROCHA LIMA a invulgar notoriedade que então lhe trouxeram os felizes resultados dessas pesquizas, pois centenas de outras, com o mesmo fim de esclarecer o problema do Tifo exantemático, ao mesmo tempo febrilmente executados pelos cientistas de todos os países beligerantes, não alcançaram identico sucesso. A isso também se liga o fato significativo de não ter sido o seu nome calado, mas sim tres vezes citado no livro do Prof. HIS, intitulado "O front medico na grande guerra". Daí também os numerosos convites que recebeu durante a guerra para demonstrar e relatar as suas experiencias em congressos e sociedades sábias da Alemanha, da Polonia e da Austria.

Além da caracterisação do novo microbio *Rickettsia prowazeki*, agora unanimemente aceita, e das investigações sobre a filtrabilidade e numerosas outras propriedades do virus exantemático, indicou o Prof. ROCHA LIMA o melhor caminho para a obtenção da vacina contra o tifo petequial, o que também foi confirmado por pesquizas ulteriores.

Além disso ocupou-se também ROCHA LIMA, durante a guerra, com estudos experimentais sobre a transmissão do Tifo recurrente e sobre a Febre das trincheiras, cujos resultados, como os de seus outros trabalhos, ainda hoje continuam de pé.

No campo das doenças de animais salientam-se os seus estudos sobre o carbunculo sintomático, por ocasião dos primeiros ensaios sobre a vacina contra a peste da manqueira do Instituto de Manguinhos, em 1905, e mais tarde a descoberta do processo para demonstrar o virus da bouba das aves no interior das inclusões caracteristicas dessa doença.

Foi ROCHA LIMA quem verificou e demonstrou que o *Histoplasma capsulatum*, descoberto por DARLING no Panamá, não é um protozoario, como se supunha, mas um cogumelo semelhante ao parasita da linfagite epizootica dos equinos. Esses trabalhos serviram de ponto de partida para os demais sobre as blastomicóses, que o levaram a estabelecer sobre bases histopatologicas a classificação hoje mais adotada desse importante grupo de doenças.

Também sobre a doença de Chagas publicou ROCHA LIMA importantes contribuições, tanto quanto à evolução do parasita nos tecidos, como em artrópodes, assim como sobre a patogenese das lesões organicas da doença.

A sua lição inaugural da Universidade de Hamburgo versou sobre os Clamidozoarios, assunto sobre o qual havia, juntamente com PROWAZEK, esboçado a publicação de um livro, que assim

como um outro sobre a Histopatologia das Doenças Tropicais, ainda não conseguiu levar a termo.

Na sua obra cientifica publicada em mais de 60 trabalhos originais, na maioria em lingua alemã, predominam os assuntos de microbiologia ligados as mais das vezes à histologia patológica e à medicina tropical.

ROCHA LIMA contribuiu com uma série de importantes monografias para as maiores enciclopédias médicas alemãs da atualidade, como sejam os grandes tratados de MENSE sobre molestias tropicais, de KOLLE e WASSERMANN sobre Microbiologia, de JADASSOHN sobre Dermatologia, de ABDERHALDEN sobre Metodos da Biologia, de KLEMPERER sobre Medicina interna e de PROWAZEK sobre Protozoologia.

O prestigio adquirido nessa longa atividade cientifica, na Alemanha, pôz sempre ROCHA LIMA ao serviço de todos os patricios que constantemente a ele recorriam em Hamburgo, à procura de recomendações, auxilios e conselhos e, nessa tarefa, assim como também auxiliando e aconselhando muitos alemães em caminho para o Brasil, dedicava uma parte preciosa de sua atividade. Maior esforço ainda dispendia em salientar com o seu prestigio os trabalhos e os cientistas brasileiros, muitos dos quais a isso devem o haverem aparecido mais na literatura alemã do que na de outros países. Assim também contribuiu bastante para distinções excepcionais dispensadas pela Alemanha a Institutos e homens de ciencia do Brasil.

Em 1920 foi o Prof. ROCHA LIMA convidado pelo governo de S. Paulo para dirigir o Instituto de Butantan, deixando de aceitar o convite por não lhe serem garantidos os meios de reorganizar esse Instituto como um centro de ciencia.

Em 1928, vindo de Hamburgo em missão cientifica a colaborar juntamente com o Prof. JAKOB em cursos organizados no Rio de Janeiro, foi convidado pelo governo de S. Paulo para auxiliar, como Subdiretor, a organização do Instituto Biologico, que acabava de ser creado. Na esperança de poder dar a seu país os frutos de sua experiencia colhidos em mais de 20 anos de vida cientifica na Alemanha, aceitou a incumbencia e imprimiu logo feição propria à orientação dos trabalhos sob sua direção, iniciando a formação de um nucleo de verdadeiros cientistas pesquizadores, cuja competencia e orientação constituem os sólidos fundamentos em que se devem apoiar as medidas da defesa sanitaria da agricultura.

Ao cabo de pouco tempo eram os laboratorios a cargo de ROCHA LIMA considerados como um dos principais centros de trabalho cientifico do país; as realisações no terreno da defesa sanitaria, então somente permitidos ao Instituto no terreno da avicultura, conquistavam fa-

ma de modelares e vieram trazer decisivo apoio a este ramo da nossa industria animal. O livro sobre doenças das aves, de REIS e NÓBREGA, nascido nesse ambiente, é talvez a unica obra brasileira que na opinião de todos os especialistas estrangeiros tenha conquistado a qualificação de obra-prima da literatura mundial sobre o assunto.

Em 1933 foi a ROCHA LIMA, até então apenas subdiretor chefiando a Divisão Animal, confiada a superintendencia geral na direção do Instituto Biologico, posto em que se vem com crescente sucesso esforçando por colocar todos os serviços do Instituto no alto nivel daquele que desde 1928 vinha orientando e organisando, nivel perfeitamente equivalente ao dos grandes Institutos européus. O Instituto Biologico deixou de ser uma repartição técnica para tornar-se um dos centros cientificos mais fecundos e mais acatados do país e mesmo do Continente.

Além da Cruz de Ferro da grande guerra, recebeu ROCHA LIMA depois dela a medalha de benemerencia do Papa PIO XI, em recompensa de trabalhos cientificos apresentados em 1925 na exposição missionaria em Roma, e foi ainda por duas vêses, após a sua vinda para o Brasil, objéto de especial distinção tanto por parte do Instituto de Doenças Tropicais de Hamburgo, conferindo-lhe a Medalha Nocht, como do governo alemão conferindo-lhe as insignias de honra da Cruz Vermelha Alemã, como pela Imperial Academia Alemã de Ciencias Naturais, que o escolheu unanimemente para seu membro efetivo.

ROCHA LIMA é membro efetivo das sociedades alemãs de Microbiologia, de Anatomia Patológica, de Medicina Tropical e de Dermatologia, e membro honorario da Academia de Medicina do Rio de Janeiro, das Sociedades de Medicina e Cirurgia de S. Paulo e Rio de Janeiro, da Sociedade Russa de Protozoologia, e da Soc. Norte-americana de medicina tropical.

Em 1938 foi condecorado pelo governo alemão com o titulo de Cavalheiro da Ordem da Aguia.

Ultimamente foi escolhido para vice-presidente do Congresso de Microbiologia que se reuniu em Setembro de 1939 nos Estados Unidos.

## TRABALHOS CIENTÍFICOS DO PROF. ROCHA LIMA

1901 — ESPLENOMEGALIA NAS INFECÇÕES AGUDAS. Tese.
Rio de Janeiro.

1906 — CARBUNCULO SYMPTOMATICO
Juiz de Fóra.

1912 — ZUR ENTWICKLUNG VON SCHIZOTRYPANUM CRUZI IN SÄUGETIEREN (M. MAYER colabor.)
Arch. Schiffs-u. Trop. Hyg. Beiheft 4, 90.

1912 — ÜBER DAS VERHALTEN DES ERREGERS DER BRASILIANISCHEN TRYAPANOSOMIASIS DES MENSCHEN IN DEN GEWEBEN
Verhdl. Deutsch. Path. Ges. 15. Tag., 454.

1912 — ZUR PATHOLOGISCHEN ANATOMIE DES GELBFIEBERS
Verhdl. Deutsch. Path. Ges. 15. Tag., 163.

1912 — ZUR PATHOLOGISCH-ANATOMISCHEN DIAGNOSE DES GELBFIEBERS
Arch. Schiffs-u. Trop. Hyg. 16, Beiheft 1.

1912 — HISTOPLASMOSIS UND EPIZOOTISCHE LYMPHANGITIS
Arch. f. Schiffs-u. Trop. Hyg. 16, 1.

1913 — BEITRAG ZUR KENNTNIS DER BLASTOMYKOSEN, LYMPHANGITIS EPIZOOTICA UND HISTOPLASMOSIS
Centralbl. Bakt. Orig., 67, 233.

1913 — UNTERSUCHUNGEN ÜBER VERRUGA PERUVIANA (M. MAYER u. H. WERNER colab.)
Münch. Med. Wochschr. 14.

1913 — ÜBER DIE ZÜCHTUNG VON MALARIAPARASITEN NACH DER METHODE VON BASS (H. WERNER colab.)
Arch. Schiffs-u. Trop.-Hyg. 17, 541.

1913 — ZUR DEMONSTRATION VON CHLAMYDOZOEN
Verhdl. Deutsch. Path. Ges. 16. Tag., 409.

1913 — ZUR HISTOLOGIE DER VERRUGA PERUVIANA
Verhdl. Deutsch. Path. Ges. 16. Tag., 409.

1914 — VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WASSERMANNSCHE REAKTION BEI MALARIA
Dermatol. Wochschr. 58, 39.

1914 — PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE BEOBACHTUNGEN BEI EINIGEN TROPENKRANKHEITEN
Internat. Med. Kongress London 1914, Sektion XXI.

1914 — ZUM VERHALTEN VON SCHIZOTRYPANUM CRUZI IN WARMBLÜTERN UND ARTHROPODEN. (M. MAYER colab.)
Arch. Schiffs-u. Trop.-Hyg. 18, Beiheft 5.

1914 — DEMONSTRATION ÜBER VERRUGA PERUVIANA (M. MAYER colab.)
Arch. Schiffs-u. Trop.-Hyg. 18, Beiheft 7.

1914 — GELBFIEBERGRUPPE UND VERWANDTE KRANKHEITEN
Prowazeks Handb. d. path. Protoz. 780.

1916 — BEOBACHTUNGEN BEI FLECKTYPHUSLÄUSEN
Arch. Schiffs-u. Trop.-Hyg. 20, 17.

1916 — ÜBER DAS FLECKFIEBER
Verhdl. ausserordtl. Tag. Deutsch. Kongr. inn. Med. Warschau Mai 1916.

1916 — ZUR ÄTIOLOGIE DES FLECKFIEBERS. VORL. MITTEILUNG
Berl. Klin. Wochschr. 21.

1916 — UNTERSUCHUNGEN ÜBER FLECKFIEBER
Münch. Med. Wochschr. 39.

1916 — ZUR ÄTIOLOGIE DES FLECKFIEBERS
Centralbl. allg. Path. 27, Beiheft Kriegspath.

1916 — ZUR ÄTIOLOGIE DES FLECKFIEBERS. BEMERKUNGEN ZU DEN IN NR. 38 U. 41 DIESER WOCHENSCHRIFT ERSCHIENENEN AUFSÄTZEN V. TÖPFER UND SCHÜSSLER
Deutsch. Med. Wochschr. 44.

1916 — DIE URSACHE DES FLECKFIEBERS
Die Umschau 20,51.

1916 — DIE ERGEBNISSE DER FLECKFIEBERFORSCHUNG
Vortr. Senckenberg'schen naturforsch. Ges. Frankfurt a. M. November 1916. Veröff.: Feldärztl. Bl. d. 2. Armee nr. 21.

1917 — ZUM NACHWEIS DER RICKETTSIA PROWAZEKI BEI FLECKFIEBERKRANKEN
Münch. Med. Wochschr. 2.

1917 — ZUR ÄTIOLOGIE DES FLECKFIEBERS (ERWIDERUNG AUF D. AUSFÜHRUNG TÖPFERS IN NR. 49)
Deutsch. Med. Wochschr. 2.

1917 — DIE SCHUTZIMPFUNG GEGEN FLECKFIEBER
Med. Klinik 43.

1917 — KLINIK UND ÄTIOLOGIE DES SOGENANNTEN WOLHYNISCHEN FIEBERS (WERNER HISSCHE KRANKHEIT) (F. MUNK colab.)
Münch. Med. Wochschr. 42, u. 44.

1918 — SCHUTZIMPFUNGSVERSUCHE GEGEN FLECKFIEBER
Münch. Med. Wochschr. 52.

1919 — DIE ÄTIOLOGIE DES FLECKFIEBERS
Ergebn. allg. Pathol. Lubarsch u. Ostertag. 19,159.

1919 — ÜBER DIE ÄTIOLOGIE DES FLECKFIEBERS
Berl. Klinik 325.

1919 — ÜBER LARBISCH UND WOLOSSJATIK (Hautmaulwurf). (F. FÜLLEBORN colab.)
Arch. Schiffs-u. Trop. Hyg. 23.

1919 — DIE ÜBERTRAGUNG DES RÜCKFALLFIEBERS UND DES FLECKFIEBERS. BEMERKUNGEN ZUR RICKETTSIAFRAGE
Deutsch. Med. Wochschr. 27.

1920 — GELBFIEBER
Deutsch. Koloniallexikon I. herausgeg. v. H. Schnee.

1920 — PESQUIZAS SOBRE O TYPHO EXANTHEMATICO DURANTE A GUERRA MUNDIAL
Vortr. Academia Nacion. Med. Rio de Janeiro.

1920 — INTRODUCCION EN EL ESTUDIO DE LOS CLAMIDOZOARIOS
Revista Medica de Hamburgo 5.

1920 — CHLAMYDOZOEN — STRONGYLOPLASMEN. (Nachtrag.)
Prowazeks Handbuch d. pathog. Protoz. 2,934.

1921 — NOTAS SOBRE O MICROBIO DO TYPHO EXANTHEMATICO
Rev. Medica de Hamburgo, 1/2.

1921 — DA IMPORTANCIA PRATICA DAS LESÕES DO FIGADO NA FEBRE AMARELA
Revista medica, 2, 11.

1923 — ÜBER DIE EXOTISCHEN HAUTKRANKHEITEN: GRANULOMA VENEREUM, ULCUS TROPICUM, FRAMBÖSIE, VERRUGA PERUVIANA, DERMATITIS VERRUCOSA, BLASTOMYKOSE, LEISHMANIOSE
Karlsbader ärztl. Vortr. Intern. ärztl. Fortbild. Kurs. Balneologie u. Balneotherapie.

1924 — ÜBER BLASTOMYKOSE, VENERISCHES GRANULOM UND KLIMATISCHE BUBONEN
Arch. Dermatologie u. Syph. 145, 312.

1924 — CLIMATOLOGIE VON BRASILIEN
Vortr. in Homburg.

1925 — VERRUGA PERUVIANA UND TELEANGIEKTATISCHE GRANULOME
Arch. Schiffs-u. Trop. Hyg. 29.

1925 — METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON LÄUSEN ALS INFEKTIONSTRÄGER (H. SIKORA colab.)
Handb. Biol. Arbeitsmeth. Abderhalden.

1925 — HISTOPATHOLOGIE DER EXOTISCHEN BLASTOMYKOSEN
Verhdl. Deutsch. Path. Ges. 20. Tag. Würzburg.

1926 — VERRUGA PERUVIANA. OROYAFIEBER
Handb. Tropenkrankh. Mense, IV.

1926 — TYPHO EXANTHEMATICO
Vortr. Deutsch. Inst. Univ. Coimbra.

1926 — INSTITUTO DE MOLESTIAS TROPICAIS DE HAMBURGO
Vortr. Deutsch. Inst. Univ. Coimbra.

1926 — DIAGNOSTICO POST-MORTAL DA FEBRE AMARELA
Folha Medica.

1927 — ÜBER VERRUGAÄHNLICHE ERKRANKUNGEN (Pseudoverrugas)
Abhandl. Geb. d. Auslandskunde, Hamburg Univ. Festschr. Nocht.

1927 — VENERISCHES GRANULOM (M. MAYER colab.)
Handb. Haut-u. Geschl.-Krankh. 21, 433.

1929 — GELBFIEBER (M. COUTO colab.)
Handb. Tropenkrankh. Mense, 3. Aufl. 5, 673.

1929 — AMERIKANISCHE TRYPANOSOMENKRANKHEIT. CHAGAS-KRANKHEIT (C. CHAGAS u. E. VILLELA colab.)
Handb. Tropenkrankh. Mense, 3. Aufl. 5, 673.

1929 — SOBRE A ANATOMIA PATHOLOGICA DA FEBRE AMARELA
Folha Clinica e Biologica 1,4.

1929 — GELBFIEBER
Neue Deutsche Klinik, G. u. F. Klemperer, III, 738.

1929 — REFUTAÇÃO
Sciencia Medica 10.

1930 — RICKETTSIEN
Handb. pathog. Mikroorg. Kolle, Kraus u. Uhlenhuth, 3. Aufl. VIII, 1049.

1930 — VERRUGA PERUVIANA. OROYAFIEBER
Handb. pathog. Mikroorg. Kolle, Kraus u. Uhlenhuth, 3. Aufl. VIII. 1050.

1932 — PROTOZOEN UND HAUT (M. MAYER colab.)
Handb. Haut-u. Geschl.-Krankh. Jadassohn II, 1.

1932 — EXOTISCHE BLASTOMYKOSEN
Handb. Haut-u. Geschl.-Krankheiten, Jadassohn, XII, 366.

1932 — VERRUGA PERUVIANA ODER CARRIONSCHE KRANKHEIT (OROYAFIEBER)
Handb. Haut-u. Geschl.-Krankheiten, Jadassohn XII, 215.

1937 — RÜCKBLICKENDE BETRACHTUNGEN ÜBER DIE ENTWICKLUNG DER HISTODIAGNOSE DES GELBFIEBERS
Festschr. Nocht. 1937, Inst. f. Schiffs-u. Tropenkrankh. Hamburg 497-512.

1939 — METHODEN DER VIRUSFORSCHUNG (J. REIS u. K. SILBERSCHMIDT colab.)
Handb. Biol. Arbeitsmeth. Abderhalden, Lief. 480 in Abt. XII, Teil 2.

———o———

# DEPOIMENTO DE CONDISCIPULO

E'-me impossivel fixar a data das minhas primeiras relações com HENRIQUE DA ROCHA LIMA.

Eramos ambos meninotes quando nos conhecemos em Petropolis onde costumava passar os verões em casa de seus avós os Barões de Saúde. E por mais longe que me levem as reminiscencias de infancia, vejo em casa de meus Paes a figura do grande clinico e do perfeito cavalheiro que era seu ilustre Pae, encarnação da cordialidade e da simpatía, desses medicos cuja simples presença infunde aos enfermos o maior alento e confiança na recuperação da saúde.

Frequentavamos, ROCHA LIMA e eu, as mesmas classes nos colegios Brasileiro Alemão e de S. Vicente de Paula, ambos em Petropolis. Ótimas amizades me ficaram desse tempo, como a sua e, entre outras, as de outros dous rapazinhos que vieram a pertencer ao grupo dos brasileiros que mais honram e ilustram o Brasil actual: João e Roberto Marinho de Azevedo.

No Colegio de S. Vicente de Paula fomos colegas de banco na aula de latim. Tivemos como professores os virtuosissimos sacerdotes Padres Symphronio Torres e José Venancio de Mello. Faleceu o primeiro, após incansavel apostolado na Santa Casa de Misericordia do Rio de Janeiro, por ocasião do grande surto amarílico de 1894, a que viera expor-se, apezar de filho do planalto mineiro e desaclimado do Rio. E o Padre José Venancio de Mello acaba de desaparecer do mundo após quarenta anos de pratica, no mais alto grau, dos ensinamentos de fundador de sua gloriosa ordem: São Vicente de Paula. O que realisou no Recife na zona dos mocambos foi simplesmente espantoso, e o seu sepultamento, acompanhado por vinte mil populares, humildes na maioria, constituiu verdadeira consagração de uma existencia admiravel de filantropia e abnegação.

Eram ambos mestres severos e exigentissimos e instituiam terriveis torneios nas suas classes. Nestas justas jamais conseguiu quem quer que fosse arrebatar a ROCHA LIMA a primazia invencivel, graças á memoria e agilidade de inteligencia.

— Vae dar um grande latinista — augurava o excelente Padre Symphronio Torres.

Mas orientava o latinista adolescente as poderosas faculdades para outro campo. Estou certo, comtudo, de que dessas justas na arena de Clintock do *Epitome* e do *De Bello Gallico* lhe ficou uma base sinceramente invejavel, sobretudo por aqueles que — ai d'eles! — apenas se lembram da declinação de *rosa, servus* e *arbor*, já indecisos sobre as de *currus* e *res*. Quanto ás conjugações... nem falemos...

As diretrizes de nossas vidas nos separaram. Desapareceu prematuramente o excelente amigo e o grande medico que era o Dr. Rocha Lima.

Formou-se Henrique em medicina e os écos de seus triunfos me chegaram frequentes a S. Paulo, como discipulo querido de Oswaldo Cruz, seu grande mestre em Manguinhos. Foi-se para a Europa onde a fama se lhe acresceu notavelmente. Ouvi falar de suas vitorias como bateriologista, de seus estudos sobre tifo exantematico no Instituto de Molestias Tropicais de Hamburgo, etc.

Afinal, passadas dezenas de anos, nos revimos quando voltava ao Brasil coberto dos mais justos louros, para de novo se fixar no solo patrio.

Recordar-lhe os méritos torna-se impertinente. E' afrontar o clamor publico de universal consagração.

Extraviam-se estas minhas linhas singelas no meio das austeras contribuições dos cientistas que se reuniram para homenagear um mestre da Biologia, de mundial renome. Vale como mero preito de justiça este depoimento do condiscipulo, documentador de quanto se realizaram as promessas de carreira do rapazinho que aos dez anos timbrava em ser um estudante *hors ligne* e, apoiado em poderosas faculdades de precoce desenvolvimento, maravilhava professores e colegas.

(a) *Affonso de E. Taunay*

———o———

Laboratoire de Parasitologie
de l'institut vétérinaire à Léningrade (U.R.S.S.)
Rue Tschérnigowskaia, 5.

## Ao Professor Dr. HENRIQUE DA ROCHA LIMA

Mui estimado colega:

Permiti-me e aos meus colaboradores na minha catedra de parasitologia do Instituto de Veterinaria de Leningrado e do Laboratorio, por mim chefiado, para o estudo das molestias protozoicas dos animais domesticos, transmitir-vos nossas sinceras felicitações pelo vosso sexagesimo aniversario.

Vossos trabalhos no dominio da protozoologia, feitos tanto na Europa como no Brasil, são brilhantes exemplos de um cientista talentoso.

A vossa descoberta do agente causal do tifo exantematico — Rickettsia prowazeki — forneceu á humanidade elementos para a luta contra essa terrivel infecção.

Tanto este como muitos outros trabalhos deram-vos renome mundial como notavel cientista.

Vossa incansavel atividade de administrador emprestou ao Instituto Biologico de São Paulo o titulo de um dos mais destacados estabelecimentos do genero.

Juntando nossas entusiasticas felicitações ás que vos são transmitidas pelos cientistas de todo mundo, fazemos votos para que vossa atividade cientifica perdure longos anos e que vossa patria e toda humanidade usufruam os beneficios de vossa previlegiada capacidade de trabalho.

Vossos colegas e admiradores

Leningrado, IX-1939

*Prof. Dr. V. L. Yakimoff*
*Dozent: E. F. Rastegaieff, Mme.*
*„ W. F. Gousseff*
*Assistent: Mme. Melnikoff*

# CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE "CEPHALOSPORIUM RECIFEI"

POR

F. Almeida e F. A. Simões Barbosa *

Da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo

Com as estampas 1-2

Em um trabalho em via de publicação fazemos um estudo de conjunto dos micetomas maduromicóticos observados no Brasil. Com o presente trabalho trazemos uma contribuição para o estudo morfo-biológico do *Cephalosporium recifei* isolado e identificado por ARÊA LEÃO e J. LOBO em 1934.

Este cogumelo foi isolado pelo último autor, em Pernambuco, de um micetoma de grãos branco-amarelados: tratava-se de um indivíduo do sexo masculino, brasileiro, de 34 anos. O pé direito, séde das lesões, estava aumentado de volume, deformado; apresentava formações nodulares e grande número de fístulas deixando sair, sob pressão, um líquido soro-purulento no qual se encontravam grãos branco-amarelados. Os ossos do tarso estavam atacados.

Recebemos de J. LOBO uma preparação histológica e aí encontramos apenas um grão sem clavas, constituido na parte central por filamentos espêssos, septados, apresentando em alguns pontos elementos simulando clamidosporos. Na porção periférica alguns elementos mostravam-se bem corados, simulando clavas. As figuras *A* e *B* da estampa 1, melhor que qualquer descrição, mostram-nos essa morfologia. Juntamente com a preparação recebemos também uma amostra da cultura isolada por aquele autor. Essa amostra figura na micoteca departamental sob o número 1057.

Com o intuito de tornar mais conhecidos certos caracteres morfológicos apresentados pela amostra em apreço, resolvemos apresentar alguns dados. Para isso estudamo-la em vários meios culturais:

E m Sabouraud glicose, com 3 dias de idade, as colônias são pequenas, penugentas, de côr branca. Com 20 dias têm o seguinte aspecto: centro elevado, apresentando em torno zona creme uniforme e margem branca. Penugem muito curta; a medida que envelhece o pigmento torna-se mais escuro, e o meio adquire tonalidade pardo-escura.

Em Sabouraud glicose distribuido em balões de Ehrlenmeyer desenvolve-se colônia gigante com aspecto

* Comissionado pela bolsa de estudos "Diários Associados".

semelhante ao anterior. Atinge 2 cms. de diâmetro com 8 dias de idade. Com 25 dias tem o centro elevado, de côr creme e a margem muito clara ou branca; o diâmetro oscila entre 3 e 4 cms.

Em Sabouraud glicose líquido forma, no início, flocos brancos no fundo do tubo; já com 5 dias vê-se um anel na superfície, anel êsse que passa a véu completo, de côr creme, aos 25 dias.

Em Sabouraud maltose, com 15 dias, o centro da colônia tem penugem mais elevada. O aspecto é mais ou menos o mesmo que em glicose. Coloração creme.

Em Sabouraud mel a colônia gigante apresenta aspecto completamente diverso. Desde o início o crescimento se faz com hifas aéreas abundantes. Desenvolvimento muito rápido, apresentando a colônia em poucos dias aspecto flocoso. Penugem de côr creme (Estampa 2, fig. *C*).

Em gelose simples o crescimento é menos rápido que nos outros meios. Colônias planas, úmidas, de côr branco-amarelada.

Em gelatina o desenvolvimento é superficial, formando enduto branco-amarelado. Crescimento insignificante e muito lento no canal da picada. Não ha liquefação do meio.

Em agar Worth as colônias são de côr creme, apresentando superfície ligeiramente úmida e brilhante. Podem aparecer neste meio formações longas constituidas por hifas férteis entrelaçadas (Estampa 2, fig. *D*) simulando corêmios.

Em agar Czapek apresenta colônias penugentas de côr branca no início. Com 20 dias de idade mostra uma zona central de côr amarelo-esverdeada, com botão central mais elevado, de côr creme. Margem penugenta de côr branca.

Em colônia gigante (Czapek) o cogumelo atinge 2,5 cms. de diâmetro com 8 dias. Aos 20 dias apresenta aspecto absolutamente característico: zona central amarelo-esverdeada, côr de limão, com botão central creme. Entre esta zona e a próxima existe uma de transição, de côr rósea nítida. Limitando a colônia observa-se zona penugenta branca (Estampa 2, fig. *E*).

O cogumelo apresenta acentuado polimorfismo, não só em relação ao meio de cultura, como à temperatura.

Em Sabouraud glicose, a 37°, com 20 dias de idade, apresenta zona central muito elevada, de côr branco-rosada, coberta por penugem curta, perfeitamente limitada por uma zona externa glabra, creme pálida, dividida por sulcos transversais em toda a sua extensão.

Procurando estudar algumas propriedades bioquímicas do *Cephalosporium recifei* fizemos semeadura em meios açucarados e verificámos que produz ácido com glicose, tardiamente com sacarose (13 dias). Não fermenta a lactose, maltose, nem a manita. A observação foi feita durante 30 dias.

Ao exame microscópico apresenta micélio hialino, septado, medindo 2 a 4 μ. Conidióforos simples, hialinos, retos, ora pequenos, ora longos, alcançando 20 e mesmo 30 μ. Conídios lisos, hialinos, em fórma de crescente quando livres. Suas dimensões vão de 5-6 μ x 0,5 — 1 μ. Formam-se um a um e vão se aglomerando em capítulo na extremidade do conidióforo.

O estudo desta espécie é interessante por ter sido o gênero *Cephalosporium* encontrado pela primeira vez como causador de um caso de micetoma maduromicótico. Recentemente foi observado um segundo caso em Porto Rico, por B. CARRASQUILLO. O estudo micológico dêste caso foi publicado por CARRIÓN em "Mycopathologia", V. II, fasc. 3, 26-III-940.

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF "CEPHALOSPORIUM RECIFEI"

*Abstract*

*The A. A., following their studies on maduromycosis in Brasil, describe for better documentation the Cephalosporium recifei Leão & Lobo. They found a characteristic appearance on Czapek's medium.*

*The fungus was obtained from a case of mycetoma in Pernambuco, and it is the first case of mycetoma produced by a specimen of this genus registered in medical litterature.*

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, F. — 1936 — Considerações em torno da distribuição dos micetomas no Brasil. *Folia Clinica et Biologica*, **8**: 127.

ALMEIDA, F. — 1932 — Considerações sôbre o diagnóstico histopatológico dos mycetomas. *Rev. Biol. Hig.*, **3**: 93.

ALMEIDA, F. — 1939 — Mycologia Medica. Estudo das Mycoses Humanas e de seus Cogumelos.

ALMEIDA, F. e SIMÕES BARBOSA, F. A. — Contribuição para o estudo dos micetomas maduromicósicos observados no Brasil. (Em publicação).

ARÊA LEÃO, E. A. e LOBO, J. — 1934 — Micetoma podal a Cephalosporium recifei n. sp. *Correio Medico*, e *C. R. Soc. Biol.*

CARRASQUILLO, B. — 1938 — Madura foot in Puerto Rico — case report. *Bol. Asoc. Med. P. Rico* **30**: 452.

———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 1

Fig. *A* — Secção histológica de um grão; hematoxilina-eosina, 200×.
Fig. *B* — O mesmo grão, aumento 1000×.

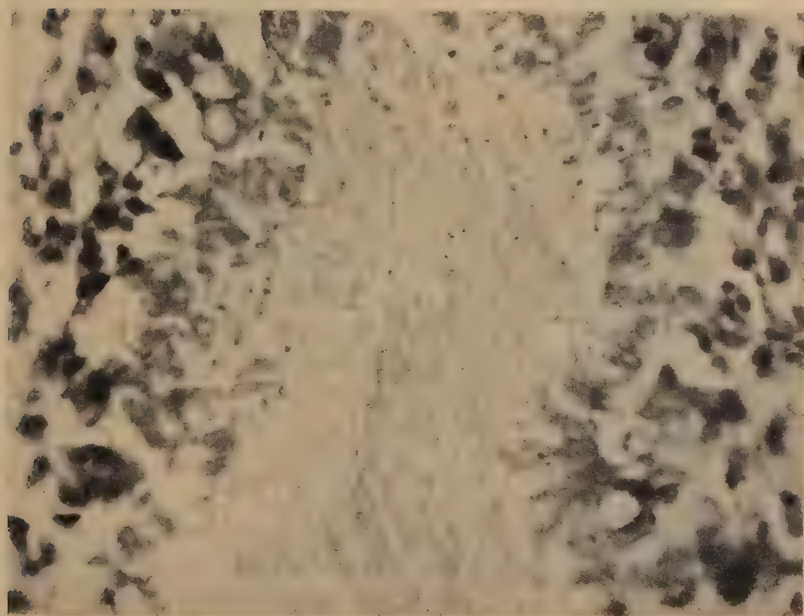
### Estampa 2

Fig. *C* — Colônia gigante em mel Sabouraud com 20 dias.
Fig. *D* — Agar Worth com 20 dias.
Fig. *E* — Czapek com 20 dias.

o — —



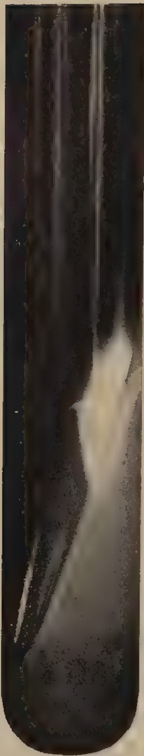
*A*



*B*



C



D



E

# OBSERVAÇÕES SÔBRE A RESISTÊNCIA DAS CULTURAS DE "LEISHMANIA BRASILIENSIS" A VÁRIAS TEMPERATURAS *

POR

A. D. Franco do Amaral

Do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo

HINDLE e PATTON (2), em 1926, pela primeira vez, tiveram a idéia de estudar a resistência de flagelados a baixas temperaturas.

Como membros da "Kala Azar Commission of the Royal Society", trabalhavam no Norte da China, região sujeita a invernos rigorosos, atingindo o termómetro, com frequência, na Província de Shantung, a — 20°C.

A forma flagelada da Leishmania, no inseto vetor, estaria sujeita, pois, em tais regiões, a sofrer a ação de temperaturas muito baixas. Seria de supor-se uma particular resistência de tais formas flageladas, ao frio, para poderem persistir através de invernos tão rigorosos.

Examinaram aqueles pesquisadores grande número de insetos hibernantes, com o fim de averiguar se flagelados naturais poderiam persistir durante o inverno. De tais investigações resultou encontrarem flagelados ativos no trato alimentar de fêmeas hibernantes de *Culex fatigans*, bem como no de fêmeas de um *Pentatomidae*, nas mesmas condições.

Em aditamento a essas observações, fizeram os mesmos autores estudos com culturas de Leishmania, para verificar se, em tais condições, o estádio flagelado era igualmente resistente ao frio.

Suas observações, de grande interêsse, serão a seguir resumidas, para cotêjo com as experiências que empreendemos.

## 1.ª EXPERIÊNCIA

Quatro culturas de *Leishmania* de 12 dias, em um meio de NNN de WENYON, foram colocadas fora da janela do laboratório durante uma noite toda, em que a temperatura caíu a — 10°C. No dia seguinte uma das culturas foi examinada depois de ter permanecido por duas horas à temperatura do laboratório, tendo sido encontrados flagelados ativos. Todas as culturas foram então deixadas fora seis dias, durante os quais a temperatura noturna variou entre — 6°C e — 10°C, tendo a temperatura diurna raramente subido além do ponto de congelação. As culturas foram a seguir colocadas a uma temperatura de + 20° C por 3 horas, e ao cabo todas continham flagelados ativos.

* Trabalho lido na Reunião de 13 de junho de 1940 da Ass. Paulista de Medicina.

2.ª EXPERIÊNCIA

Seis culturas contendo numerosos flagelados ativos foram deixadas ao relento. As temperaturas noturnas durante os quatorze dias subsequentes variaram entre — 7°C e — 12°C e a máxima diurna só uma vez subiu a + 6°C.

No fim de tres dias, uma cultura, examinada após uma hora de permanência a + 20°C, continha flagelados ativos; recolocada fora e examinada depois de mais 5 dias, após uma permanência de 4 horas a + 20°C, continha poucos flagelados móveis e muitas formas imóveis; voltou para fora, sendo examinada 2 dias, mais tarde, e ainda continha poucos flagelados ativos; mas, depois de um período ulterior de 6 dias, tornou-se negativa. Duas culturas foram removidas depois de uma exposição de 10 dias ao frio e ambas continham muitos flagelados ativos, ao cabo de 3 horas a + 20°C. As culturas remanescentes eram negativas após 18 dias.

3.ª EXPERIÊNCIA

Cinco tubos de cultura ativa, quatro em um meio de NNN de WENYON e um em meio de NOGUCHI e LINDENBURG, foram colocados na geladeira. Seis dias mais tarde duas culturas foram transportadas a uma temperatura de + 20°C. Ambas se apresentavam negativas após um dia, mas, no fim de seis dias, uma delas (a do meio de Noguchi e Lindenburg) continha poucos flagelados, ao passo que a outra (a do meio de NNN de Wenyon) se mantinha negativa. Deixadas à temperatura do laboratório por mais 14 dias, a última continha numerosos flagelados, enquanto a outra se tornara negativa. As 3 culturas restantes, retiradas da geladeira no fim de 20 dias e deixadas à temperatura ambiente, sempre se mantiveram negativas.

Os resultados dessas experiências mostravam claramente que o estádio flagelado da Leishmania é capaz de resistir à exposição intermitente a temperatura de — 12°C por um período ao menos de 10 dias. Mostravam mais ser o estádio flagelado capaz de resistir à congelação, pois uma hora após o degêlo se podiam observar flagelados ativos nas culturas.

Uma vez que o parasita podia persistir durante muito tempo, quando exposto ao frio em condições anormais, em que se dão modificações na concentração do ion-hidrogênio, seria natural supor que, em condições naturais, quais as do trato alimentar de um inseto hibernante, o flagelado poderia persistir durante todo o inverno.

Por sugestão do Prof. S. B. PESSOA, realizámos uma série de experiências com o fim não só de estudar a ação das baixas temperaturas sôbre as culturas de *L. brasiliensis*, como o fizeram HINDLE e PATTON com uma *Leishmania* sp., como tambem observar a influência de outras temperaturas sôbre o mesmo parasita.

Utilizámos sempre como meio de cultura o meio NNN, realizando as seguintes experiências:

I. EXPERIÊNCIA

Quatro tubos de NNN com cultura de *L. brasiliensis* de 4 dias, contendo leptomonas abundantes e em franco crescimento, foram colocados no refrigerador

em sitio onde a temperatura variou entre + 5°C e + 10°C. Três dêsses tubos foram, de tempos em tempos, retirados, deixados por 2 a 3 horas à temperatura do laboratório (cêrca de + 23°C), examinados, e recolocados no refrigerador. Um dêles permaneceu ininterruptamente à temperatura de + 5°C a + 10°C por 50 dias. Ao fim dêsse praso, tanto êste quanto os 3 primeiros tubos apresentavam-se com aspecto de cultura de muito pouca vitalidade, sendo dificil mesmo o encontro de flagelados com movimentos nítidos. Por essa razão, não os recolocámos no refrigerador, deixando-os à temperatura do laboratório pelo espaço de 2 semanas, depois do que, apresentando ainda as culturas o mesmo aspecto anterior, isto é, de vitalidade quasi nula, transplantámo-las para novos tubos de NNN. Êstes tubos de transplante, conservados em temperatura que variou de + 22°C a + 25°C, apresentaram, ao cabo de 2 semanas, formas flageladas em franco e ativo crescimento.

## II. EXPERIÊNCIA

Um tubo de NNN com cultura de *L. brasiliensis* ativa e rica foi colocado em ponto de refrigerador onde a temperatura é de — 9°C. Vinte e quatro horas depois a cultura estava congelada. Depois do degêlo, porém, o exame revelou leptomonas ativas. Durante sete dias consecutivos a mesma cultura era recolocada a — 9°C, permanecia 24 horas, congelava, era retirada; esperava-se o degêlo e praticava-se o exame, encontrando-se sempre flagelados ativos. Depois dêsses 7 dias, notando-se poucas leptomonas ativas, ficou a cultura à temperatura do laboratório por mais 12 dias, após o que se notou que houvera um enriquecimento das formas flageladas. Uma repicagem nessa ocasião deu resultado francamente positivo.

Em conclusão, uma cultura que, durante sete dias, sofrera a ação intermitente de — 9°C, manteve-se sempre positiva e, sendo repicada depois de uma permanencia de cêrca de uma semana à temperatura do laboratório, deu desenvolvimento a leptomonas.

## III. EXPERIÊNCIA

Um tubo de cultura ativa de *L. brasiliensis* ficou ininterruptamente a — 9°, durante 15 dias. Depois dêsse lapso de tempo e após o degêlo, o exame revelou leptomonas ativas. Repicada essa cultura depois de uma semana de permanência a + 22°, houve crescimento de leptomonas.

## IV. EXPERIÊNCIA

Culturas que permaneceram por mais de 15 dias sem interrupção a — 9° não revelaram mais leptomonas vivas e a repicagem, feita após uma semana, à temperatura de + 22°, nunca deu resultado positivo.

Estas experiências não só demonstraram uma acentuada resistência das culturas de *L. brasiliensis* às baixas temperaturas como tambem a possibilidade de repicá-las, com resultados positivos, depois da ação prolongada do frio. Êste último fato, isto é, a possibilidade de se conseguirem repicagens positivas com culturas que estiveram congeladas durante certo número de dias, não foi verificado por HINDLE e PATTON, que nas experiências que empreenderam apenas se limitaram a verificar a presença ou ausência de leptomonas vivas, depois da ação do frio.

Devemos assinalar que obtivemos repicagens positivas fazendo as semeaduras não imediatamente após o degêlo da cultura, mas depois de cêrca de uma semana de permanência da cultura degelada à temperatura do laboratório (+ 22° a + 25°).

Em seguida a estas experiências, procurámos verificar qual a mínima e a máxima temperatura em que uma repicagem dá resultado positivo e qual a temperatura em que o crescimento é mais exuberante.

Para isso, vários tubos foram repicados e imediatamente submetidos às seguintes temperaturas: — 9°; + 3°; + 9°; + 12° a + 13,5°; + 14° a + 16°; + 20°; + 27° a + 28°; + 30°; e + 33°.

Os exames foram praticados sempre de 8 a 12 dias após a repicagem em tais temperaturas, com os seguintes resultados:

A — 9°, + 3° e + 9°, não se verifica crescimento depois do praso referido.

À temperatura entre + 12° e + 13,5°, ha crescimento lento, notando-se poucas colónias em forma de rosetas.

À temperatura entre + 14° e + 16°, já começa a haver crescimento abundante.

A + 20°, + 27° e + 28°, as culturas se mostram ricas.

A + 30°, o crescimento começa a ser precário: a maioria dos tubos se apresentam negativos; um ou outro demonstra escasso crescimento.

A + 33°, não se observa mais crescimento.

*

* *

J. Berrebi (1), que tambem estudou a ação de diferentes temperaturas sôbre as culturas de leishmanias, diz: "En résumé, les limites de température de culture des leishmanies sont 14° et 34° et la température optime est 22°".

Com as nossas culturas de *L. brasiliensis* os limites mínimo e máximo de temperatura, em que as repicagens se mostraram positivas, foram + 12° a + 13,5° (mínimo) e + 30° (máxima). De + 20° até + 28°, as culturas crescem com exuberância.

## OBSERVATIONS ON THE RESISTANCE OF "LEISHMANIA BRASILIENSIS" CULTIVATED AT DIFFERENT TEMPERATURES

### *Abstract*

*The following are the conclusions which may be drawn from the experiments here reported:*

*1) Four days NNN-cultures incubated at 5° — 10° C, with or without interruptions, exhibited diminished vitality after 50 days, however giving good transplants.*

*2) The vitality of the cultures is lowered after 7 days of daily freezing (—9° C) and thawing (23° C), but later exposure at 23° C for 12 days restores the cultures which yield good transfers.*

*3) Continuous freezing at —9° C for 15 days has the same effects as daily freezing and thawing. Freezing for more days kills the cultures.*

*4) Cultures kept at temperatures ranging from —9° C to 9° C did not thrive; those kept at 12° — 13,5° showed scant and slow growth; at 14 — 16° C the growth was abundant; at 20 — 28° C exuberant; at 30° scare. There was no growth at 33° C.*

BIBLIOGRAFIA

1 — BERREBI, J. — 1936 — La culture des leishmanies. *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, **25**, 89-141.

2 — HINDLE, E. e PATTON, W. S. — 1926 — Resistance of Leishmania Cultures to Cold. *Proc. of the Royal Soc.*, B., **100**, 385-386.

o

# CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DE "GYMNOPOLYBIA MERIDIONALIS (IHER., 1904)" (HYM.)

POR

R. L. Araujo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 6 figuras no texto

E' intuito principal destas notas, redescrever a espécie *Gymnopolybia meridionalis* (IHERING, 1904), acentuando caracteres morfológicos outros que não a coloração, pôsto que somente a côr não permite segurança no seu reconhecimento. São, até o presente, reconhecíveis, além da forma típica, duas variedades caracterizadas pela côr, uma habitando a Amazonia e a outra, pelo material examinado, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Restará, ainda, esclarecer melhor a distribuição geográfica da sub-espécie aqui descrita, com relação a *meridionalis meridionalis*, principalmente quanto à delimitação das respectivas áreas de destribuição.

*Gymnopolybia meridionalis* criada em 1904, foi baseada na fig. 8 da estampa de SAUSSURE (1853-55). Êste autor considerou-a primeiramente como "*Polybia phthisica* FABR., var. noire", corrigindo depois para *P. fasciata;* esta última espécie, contudo, além de verdadeira *Polybia*, já naquele trabalho (est. XXIV, fig. 6) ficou claramente diferenciada. IHERING, tendo verificado o que acima ficou exposto, criou a espécie *meridionalis* para aquela *Polybia* e descreve-a: "Caracterisa-se pelo peciolo que é relativamente grosso na base e pouco alargado depois do primeiro terço, onde tem dois tuberculos. A base do segundo segmento abdominal tambem é, como os bordos posteriores dos segmentos, orlado de amarelo".

DUCKE, em 1910, incluiu-a no gênero *Stelopolybia* e, em 1914, transferiu-a para *Gymnopolybia.* Êste mesmo autor, em 1918, sugere poder ser a *Polybia multipicta* (HALIDAY, 1836) sinónimo da presente. No caso de identidade, todavia, *P. multipicta* é que, por prioridade, prevaleceria. A insuficiência da diagnose desta espécie (referente somente à côr), não me permite presentemente resolver esta questão.

Desejo expressar o meu agradecimento ao DR. FREDERICO LANE, Diretor Substituto do Departamento de Zoologia de São Paulo, pela gentileza com que me permitiu o exame do material daquele estabelecimento.

♀ — Opaca (excepto no terço inferior do clípeo, que é brilhante e apresenta tambem alguns pontos muito esparsos, providos de pêlos hirtos); escultura diminutissima, visivel somente com grande aumento; pilosidade clara, curta e densa, mais conspícua da margem do 2.° esternito abdominal para a extremidade do ab-

domen e sôbre as coxas anteriores; terço inferior do clípeo com pêlos hirtos no centro e o seu bordo franjado por pêlos bastante próximos e menores que os do disco; olhos com pêlos curtissimos e muito esparsos, visíveis com grande aumento.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos 1 e 2): 8-8¼ mm.; asa anterior: 9-10 mm. (obs.: estas medidas representam o máximo e o mínimo verificados em 20 exemplares).

Cabeça pouco mais larga que o tórax, vista de frente pouco mais larga que alta, vista de cima aproximadamente duas vezes mais larga que comprida; margem occipital fortemente côncava; espaço óculo-malar curto e estreitando-se ainda em direção ao clípeo; genas bem desenvolvidas, vistas de perfil quasi da largura dos olhos, mais largas ao nível do quinto inferior dos olhos, daí em declive acentuado para a base das mandíbulas e tambem estreitando-se gradualmente para cima, fortemente convexas vistas de cima; vértice estreitado; sutura occipital completa, iniciada ao nível da margem inferior do foramen, sua margem interna, principalmente nas extremidades, em carena fraca; triângulo ocelar não deprimido, com elevação longitudinal mediana saliente, ocelos em triângulo ligeiramente alongado, o anterior uma vez e meia mais distante dos posteriores do que êstes entre si, êstes 3 vezes e meia mais distantes dos olhos que entre si; escudo interantenal elevado, ultrapassando por uma vez a altura da base das antenas, inicia-se em seu ápice a sutura que se extende até ao ocelo anterior; clípeo pouco mais largo que alto, em sua linha mediana, na parte basal pouco e na apical mais fortemente convexo, terminado em ángulo reto e com um dente pequeno porem conspícuo ao ápice, toca lateralmente os olhos numa extensão equivalente a dois terços da largura da base das mandíbulas; antenas delgadas, muito fracamente engrossadas para a extremidade; bulbo do escapo globular, aproximadamente do tamanho do pedicelo; escapo (menos o bulbo) equivalente aos dois primeiros segmentos do flagelo, ligeiramente curvo e engrossado para o ápice; o pedicelo, mais ou menos globular, é o menor segmento; o 1.º segmento do flagelo igual em comprimento ao 2.º e 3.º reunidos; do 2.º ao 9.º (do flagelo) sub-iguais, muito ligeiramente engrossados, último segmento ½ vez mais longo que o penúltimo, direito, sua extremidade pouco afilada e terminada em ponta romba; mandíbulas duas vezes mais compridas que largas, com os lados subparalelos, superfície externa plana na base e encurvando-se para a extremidade, margem superior dobrada formando ángulo reto com a superfície externa, extremidade cortante com quatro dentes progressivamente maiores a contar de cima para baixo e uma incisão raza ao lado do primeiro dente; dentes secundários, internos, em número de três, dois dos inferiores alternando com os primários, sem ultrapassar suas bases e o terceiro em frente ao menor dente primário, todos cortantes e praticamente ao mesmo nível.

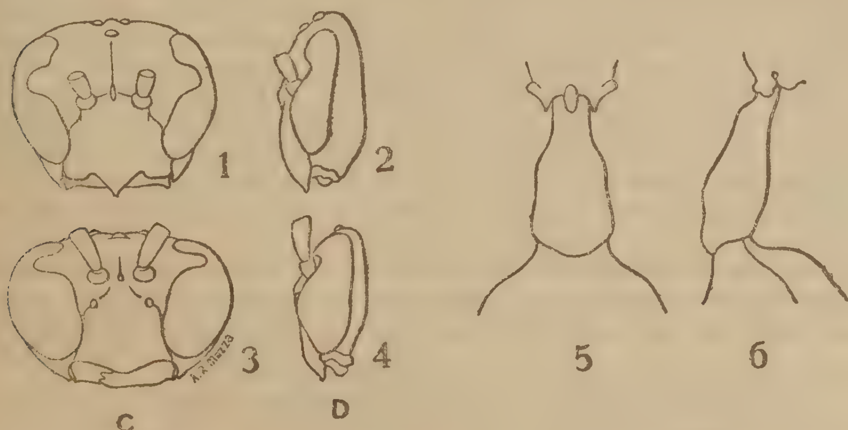
Tórax alongado, cerca de duas vezes mais longo que alto, em perfil, crista do pronoto em curva fraca, nos ángulos umerais dirigida para baixo e ligeiramente para frente e desaparecendo sem formar dentes; mesopleuras abaúladas nos dois terços inferiores; sutura mesepisternal fraca, em depressão; sutura prepectal ausente; mesonoto abaulado por igual; escutelo abaulado por igual aos lados da depressão longitudinal central; post-escutelo plano na parte central superior e abaúlado lateralmente; propódeo em declive moderado, com a depressão mediana raza, porem nítida, sem traços de estriação lateral.

Abdomen ovalado, não deprimido; pecíolo campanulado, apicalmente (1 mm.) duas vezes mais largo que na base (½ mm.), sem ângulos laterais proeminentes (êste caracter é variável, em certos exemplares quasi não se percebem

ângulos ao passo que, em outros, êstes são mais pronunciados), de comprimento igual ao propódeo e o post-escutelo reunidos; em vista lateral pouco dilatado para o ápice, sua linha superior um pouco encurvada logo depois do meio; 2.° segmento no ápice 1 vez e meia mais largo que o ápice do pecíolo.

Patas longas, garras tarsais simétricas; azas longas, hialinas.

♂ — Além dos caracteres sexuais tanto primários como secundários comuns aos demais vespídeos, os ♂♂ da presente espécie diferenciam-se das ♀♀ ainda pelos seguintes caracteres principais: cabeça mais larga que alta (3:2); clípeo mais aplanado no disco, mais alto que largo, menos abaúlado inferiormente, terminando em ângulo obtuso, tocando os olhos em extensão maior que a base das mandíbulas; espaço malar mais curto; genas pouco desenvolvidas, menos convexas vistas de cima; último segmento das antenas mais afilado, no lado superior, próximo ao ápice, ligeiramente deprimido; depressão mediana do propódeo um pouco mais larga.




*Gymnopolybia meridionalis meridionalis.* Figs. 1-2 — cabeça da ♀, vista de frente e de perfil; Figs. 3-4 — cabeça do ♂, de frente e de perfil; Figs. 5-6 — pecíolo abdominal, frente e perfil.

## Chave para as subespécies de *Gymnopolybia meridionalis* (IHERING, 1904).

1. Côr fundamental ferruginosa clara; antenas alaranjadas; azas amareladas *rufipennis* (DUCKE, 1905)
   Côr fundamental pardo-escura . . . . . . . . . . . . . . . . . . 2
2. Abundantes desenhos amarelos no tórax, cabeça e bordos de todos os segmentos abdominais, incluindo base do segundo . . . *meridionalis* (IHERING, 1904)
   Pouquissimos desenhos amarelos . . . . . . . *obscura,* nov. subsp.

## *Gymnopolybia meridionalis meridionalis* (IHERING, 1904).

*Polybia phthisica* FABR., "var. noire" SAUSS., 1853-55, Étud fam. Vesp. II, est. XXIII, f. 8.

*Polybia fasciata* SAUSS., 1853-55, l. c. corrigenda, p. CXCVIII (não est. XXIV, fig. 6).

*Polybia meridionalis* IHERING, 1904, Rev. Mus. Paulista, VI, p. 211 e 270 (est. VI, fig. 7 (ninho); DUCKE, 1907, Bol. Mus. Goeldi (Pará), V, p. 176; idem, 1908, Deutsch. Ent. Zeitschr., p. 698.

*Stelopolybia meridionalis* (IHERING, 1904) DUCKE, 1910, Ann. Mus. Nat. Hung. VIII, pp. 519 e 523.

*Gymnopolybia meridionalis* (IHERING, 1904) DUCKE, 1914, Zool. Jahrb. abt. Syst., XXXVI, Heft 2/3, p. 327; idem, 1918, Rev. Mus. Paulista, X, pp. 344 e 368; PINTO DA FONSECA, 1926, Rev. Museu Paulista, XIV, p. 173.

A côr fundamental é pardo-escura, com as seguintes maculações amarelas: cabeça, excepto duas manchas largas, da base das antenas reunindo-se no triângulo ocelar e depois atravessando o vértice fundindo-se com a faixa que ladeia quasi toda a extensão da sutura occipital; clípeo, excepto mancha alongada mediana e fino traço no bordo inferior, fino traço delimitando-o lateralmente; base do lado interno do escapo (daí para a extremidade, no lado interno, as antenas são ferruginosas); grande parte do protórax, excepto manchas irregulares alongadas laterais e faixa mais larga na frente do pronoto, abaixo da crista; duas linhas centrais e duas outras menores bordeando a metade inferior do mesonoto; grandes manchas laterais no escutelo e maior parte do post-escutelo; propódeo, excepto manchas nos cantos superiores e estreita linha central; flancos do tórax e patas, excepto manchas irregulares nas meso e metapleuras, coxas, trocânteres e fêmures posteriores; bordos de todos os segmentos abdominais, incluindo a base do segundo. As margens anteriores das asas superiores, sem atingir o ápice, apresentam tintura amarelada.

Material examinado: 22 exemplares (♂♂ e ♀♀) da coleção do Departamento de Zoologia de São Paulo, procedentes de: Franca e Itapura (Est. de São Paulo), Zororó, Guaíra (Paraná), São Leopoldo (Rio Grande do Sul) e Goiaz; Venezuela, Paraguái.

DUCKE cita ainda as seguintes localidades: México, Nicaragua, Bolívia, Amazonia Superior, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rep. Argentina.

Resta ainda esclarecer melhor a distribuição citada por DUCKE, uma vez que êste autor somente conheceu uma sub-espécie — *flavipennis* —, tendo assinalado para *meridionalis* diversas formas de coloração.

*Gymnopolybia meridionalis flavipennis* (DUCKE, 1905).

*Polybia flavipennis* DUCKE, 1905, Rev. d'Entom., p. 20; idem, 1905, Bol. Mus. Goeldi (Pará), IV, p. 686; idem, 1 c., V, 1907, pp. 176 e 182; idem, 1908, Deutsch. Ent. Zeitschr., p. 698.

*Stelopolybia meridionalis flavipennis* (DUCKE, 1905) DUCKE, 1910, Ann. Mus. Nat. Hung., VIII, p. 523.

*Gymnopolybia meridionalis flavipennis* (DUCKE, 1905) DUCKE, 1918, Rev. Mus. Paul., X, p. 364.

Esta subespécie foi descrita por DUCKE como espécie do gênero *Polybia;* tendo sido comparada com *meridionalis,* assinalou o autor que somente difere pela côr mais clara do corpo e pelas asas intensamente

amarelas e que "será talvez" apenas variedade. Até 1908 ainda a considera como bôa espécie e, em 1910, definitivamente como sub-espécie, assim se expressando: "Les deux noms ayant paru dans le même année de 1905" (o que não é exato pois que meridionalis foi descrita em 1904) "je ne suis pas sûr, lequel des deux doit être conservé; je donne la préférence à celui qui s'applique à la forme plus répandue, de vaste distribution géographique, tandis que l'autre nom se réfère à une race locale".

Material examinado: Um exemplar da col. do Dpto. de Zoologia de São Paulo (Teffé, Amazonas, Ducke leg., 12-VI-1906).

*Gymnopolybia meridionalis obscura*, nov. subsp.

Côr fundamental parda bem escura, com as seguintes maculações de um amarelo pálido: órbitas internas, ápice do clípeo, os dois terços inferiores das órbitas externas, bórdo posterior do protórax e crista, ápice das post-tégulas, orlas dos tergitos 2-3 e cantos dos dois seguintes, orlas dos esternitos 2-5. Mandíbulas de um castanho claro e a metade apical das antenas ferruginosas; coxas, trocânteres, fêmures e tíbias anteriores na face interna e tarsos totalmente amarelados; patas medianas e posteriores com as extremidades internas das tíbias e os tarsos amarelados, sendo o último segmento dos tarsos, superiormente, apenas um pouco mais claro que a côr fundamental.

Alguns exemplares apresentam mais as seguintes maculações amarelas: margem superior do post-escutelo, ângulos superiores do escutelo e duas faixas longitudinais, ligeiramente curvas exteriormente, aos lados da depressão mediana do propódeo; duas pequenas manchas nas mesopleuras, uma superior e outra mediana; duas curtas linhas longitudinais no mesonotum e tambem todas as patas com um pouco mais de amarelado; nos exemplares que apresentam estas maculações as antenas não são ferruginosas na extremidade.

Holótipo (♀) e Alótipo (♂): Juís de Fora (Minas Gerais), Araujo coll., na coleção do Instituto Biológico de São Paulo; Parátipos (Juís de Fora, Minas Gerais, Araujo, coll., e Itatiaia, Rio de Janeiro, Zikán leg.) coleções do Instituto Biológico e Departamento de Zoologia de São Paulo.

Ninho. IHERING descreveu e figurou (l. c.) um ninho bastante irregular de *Gymnopolybia meridionalis meridionalis*, coletado em Franca (Est. de São Paulo) e localisado no interior de um tronco de palmeira.

Tivemos oportunidade de observar em Juís de Fora (Minas Gerais), três colônias de *G. meridionalis obscura*: uma localizada no lado inferior de uma pequena ponte de pedras, provavelmente entre vãos alí existentes; outra em um velho tronco, e a terceira (capturada) na cavidade do tronco de um mamoeiro *(Carica papaya)*, a uma altura aproximada de 1,80 m. e iniciando-se a cavidade ao nível da bifurcação do tronco, onde tambem estava localizada a "abertura de vôo". O ninho é vertical e rigorosamente estelocítaro gimnódomo, como os demais conhecidos do gênero. Compõe-se de oito favos dos quais os dois mais exteriores completos, medem aproximadamente 30½ por 13 cms. e o

primeiro somente 18 × 4½. O oitavo e último está apenas principiado. Os favos são ligeiramente curvos sôbre o eixo maior, assumindo forma de secção longitudinal de cilindro. As células, todas completamente vasias, medem 3 mm. de largura no ápice por 9 mm. de profundidade.

Nêste ninho não foi encontrada nenhuma forma imatura do inseto. A captura foi levada a efeito em hora de temperatura firme e bastante elevada. Êste fato e as contínuas chegadas e saídas de vêspas levam a supor que certa parte da população se achava em franca atividade externa. Foram capturados cerca de 5.500 indivíduos.

## CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF "GYMNOPOLYBIA MERIDIONALIS (IHERING, 1904)" (HYM.)

*Abstract*

*In the present paper* *Gymnopolybia meridionalis* (IHERING, 1904) *is redescribed and its color forms are reviewed. A key is given for the subspecies, one of which, described as new — Gymnop. meridionalis obscura — is distinguished chiefly by a great reduction in the yellow markings as compared with the typical meridionalis. Reference is also made to the nest of the new subspecies.*

o———

# REDESCRIÇÃO E NOVOS HOSPEDEIROS DE "SCHNEIDERNEMA RETUSA (RUD., 1819) TRAV., 1927"

POR

T. L. Araujo

Da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de S. Paulo

(Lab. do Prof. Z. Vaz)

Com 8 figuras no texto

O Prof. L. TRAVASSOS estabeleceu em 1926 o gênero *Schneideria* para o *Ascaris retusa* (RUD., 1819), nematoide parasita de Dasipodídeos. No ano seguinte substituiu *Schneideria* por *Schneidernema*, por estar o primeiro nome já ocupado. O material que serviu à descrição do novo gênero foi encontrado em 1926 em tatú *(Tatusia* sp.) proveniente de Jaú, no Estado de São Paulo.

Autopsiando alguns Dasipodídeos do Alto da Serra, encontramos êsse nematoide e comparamo-lo com os exemplares de TRAVASSOS. Dessa comparação resultou a certeza de que nosso material pertence à mesma espécie.

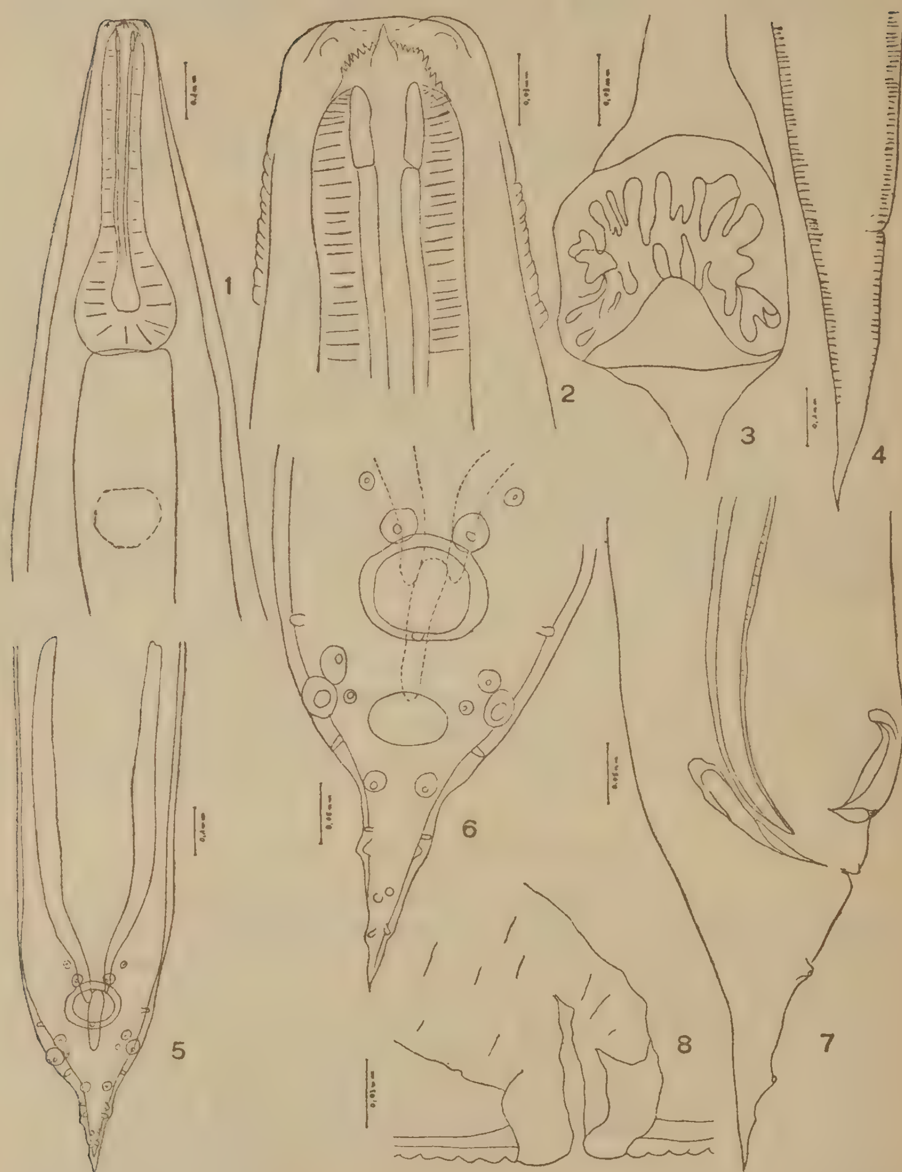
Julgamos conveniente redescrever *S. retusa*, não só porque ocorre em outros hospedeiros, como também porque no trabalho de TRAVASSOS notaram-se alguns enganos, particularmente na descrição da cauda do macho, que aproveitamos a oportunidade para retificar. Somos muito gratos ao Prof. TRAVASSOS por nos ter permitido exame do seu material.

## *Schneidernema* (TRAV., 1927)

Bôca com três lábios pequenos (tipo *Oxyuridae)* seguida dum vestíbulo cilíndrico, de paredes fortemente quitinosas. Esôfago com dilatação posterior, com dois pares de formações quitinosas dispostos cada um em forma de V invertido, com as margens externas denteadas e em correspondência com a face interna dos lábios. Póro excretor post-esofagiano, muito grande. Fêmeas pródelfas, com ovejetor dirigido de diante para trás, longo, com a primeira porção fortemente musculosa. Uteros paralelos e dirigidos para trás; ovários paralelos e dirigidos para diante. Machos com dois espículos; gubernáculo presente; ventosa précloacal com rebórdo quitinoso, azas caudais, ausentes; doze pares de papilas na extremidade posterior.

Espécie tipo: *S. retusa* (RUDOLPHI, 1819) TRAV., 1927.

*Habitat*: Intestino grosso de Dasipodídeos.




*Schneidernema retusa* (Rud., 1819): Figs. 1 e 2 — extr. ant., vista dorsal; Fig. 3 — póro excr., de frente; Fig. 4 — cauda da fêmea, lateral; Figs. 5 e 6 — cauda do macho, de frente; Fig. 7 — idem, de perfil; Fig. 8 — vulva, de perfil.

## *Schneidernema retusa* (RUDOLPHI, 1819) TRAV., 1927

**Comprimento: fêmeas, 7,8 a 8,4 mm.; machos, 6,2 a 7,5 mm.**
**Largura: fêmeas, 0,38 a 0,40 mm.; machos, 0,36 a 0,38 mm.**

Corpo de côr branca, réto, afilando-se para as extremidades, principalmente a posterior; cutícula com estriação transversal delicada; azas laterais pequenas. Bôca com três lábios, cada um com uma papila mediana e com duas outras menores, sub-marginais, aproximadas. Bôca conduzindo a um vestíbulo curto, cilíndrico, guarnecido por quatro formações quitinosas, triangulares, de ápice dirigido para diante. De cada lado e para a frente do vestíbulo duas formações quitinosas em forma de V invertido, com dentículos de pontas voltadas para diante, sendo menores os mais afastados do ápice. Esôfago curto, com 0,54 a 0,58 mm. de comprimento na fêmea e 0,41 a 0,50 mm., no macho, terminando posteriormente por uma dilatação que não apresenta a estrutura do verdadeiro bulbo esofagiano dos oxiurídeos. Intestino retilíneo, com a porção inicial mais estreita que a terminação do esôfago no macho e aproximadamente do mesmo diâmetro na fêmea.

Póro excretor grande, de bórdos irregulares, recortados, situado a 0,36 mm. para trás da terminação do esôfago e distando de 0,8 a 0,9 mm. da extremidade anterior no macho. Na fêmea dista 0,96 a 1,05 mm. da extremidade anterior do corpo e 0,4 mm. da extremidade posterior do esôfago. Anél nervoso situado de 0,27 a 0,29 mm. da extremidade anterior na fêmea, e de 0,20 a 0,25 mm. no macho.

Fêmeas com cauda cônica. Anus a 0,52 - 0,60 mm. da extremidade posterior. Vulva no terço anterior do corpo distando 2,2 a 2,6 mm. da extremidade anterior. Ovejetor com 0,20 mm. de comprimento, dirigido transversalmente de diante para trás. Uteros dirigidos para trás, com numerosos óvos de casca lisa, fina, medindo 0,050 a 0,053 mm. de comprimento por 0,037 mm. de largura. Ovários dirigidos para a frente, com algumas de suas alças ultrapassando para diante o nível da vulva.

Machos com cauda cônica. Cloaca distando 0,22 a 0,23 mm. da extremidade posterior. Espículos iguaes na forma e dimensões medindo 0,72 mm. de comprimento por 0,041 mm. na maior largura. Gubernáculo presente, pouco encurvado, com 0,12 mm. de comprimento. Ventosa pré-cloacal robusta, de rebórdos quitinosos, redonda, com 0,095 a 0,106 mm. de diâmetro, apresentando uma papila posterior. Papilas da extremidade posterior em número de 12 pares, assim dispostos: dois pares antes da ventosa; quatro pares entre a ventosa e a cloaca; seis pares postcloacais. Dos pares de papilas situadas antes da ventosa, um, o maior, está junto ao seu bordo anterior e o outro mais distante lateral e externamente. Dos pares précloacais, três são de papilas arredondadas, colocadas ao lado da cloaca, e um de papilas alongadas, laterais, situado ao nível do bordo posterior da ventosa. Dos postcloacais, o primeiro é de papilas alongadas, laterais, os restantes, de papilas menores e mais ou menos alongadas.

*Habitat*: Intestino grosso de *Cabassus unicinctus* e *Dasypus novemcinctus*.

Proveniência: Alto da Serra — São Paulo.

## REDESCRIPTION AND NEW HOSTS OF "SCHNEIDERNEMA RETUSA (RUD., 1819) TRAV., 1927"

### *Abstract*

*Schneidernema retusa (Rud., 1819)* TRAV., *1927 is redescribed and new hosts recorded.*

### BIBLIOGRAFIA

TRAVASSOS, LAURO — 1926 — Ascaris retusa (Rud., 1819). *Boletim Biologico,* São Paulo. Fasc. 4, pag. 87.

TRAVASSOS, LAURO — 1927 — *Bol. Biol.,* S. Paulo. Fasc. 10, pag. 216.

———o———

# ÜBER DIE BILDUNG DES FARBSTOFFS IM BLUTE BEI DER GELBSUCHT

VON

L. Aschoff

Der Kollege DA ROCHA LIMA hat sich wiederholt mit dem Gelbfieber beschäftigt. Ihm verdanken wir die Kenntnisse der Leberveränderungen beim Gelbfieber, worüber er in der Deutschen Pathologischen Gesellschaft auf der 15. Tagung in Strassburg 1912 berichtet hat. Seine Demonstration ist mir noch treu in der Erinnerung. Wenn ich auch selbst keine Gelegenheit gehabt habe, Gelbfieberkranke nach dem Tode zu untersuchen, so habe ich doch die Möglichkeit gehabt, mit DA ROCHA LIMA und anderen Kollegen über die Fälle von Gelbfieber und die dabei gefundenen Leberveränderungen zu sprechen. Nun herrscht gerade über die Leberveränderungen ein lebhafter Streit zwischen den Gelehrten. Ich glaube er wird sich nur schlichten lassen, wenn man bedenkt, dass auch das Gelbfieber bald in leichter bald in schwerer Form auftritt.

Ich kann natürlich hier nur von den schweren, mit Gelbsucht einhergehenden Fällen berichten. Ich will mich auf die Befunde in der Leber beim Gelbfieber gar nicht einlassen. Ich will nur etwas Grundsätzliches zur Entstehung der Gelbsucht beim Gelbfieber und anderen Krankheiten sagen.

Auf den Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin in Wiesbaden 1933 habe ich über Erkrankung der steinfreien Gallenwege gesprochen. Ich habe dabei auf die verschiedenen Möglichkeiten der Entstehung der Gelbsucht hingewiesen. Ich habe dabei die Unterscheidung zwischen dem *Ikterus toxico-infectiosus* (akute gelbe Leberatrophie), dem *Ikterus infectiosus tropicus* (Gelbfieber), dem *Ikterus infectiosus Weilii* (Weilsche Krankheit), dem *Ikterus infectiosus simplex* (katharrhalischer Ikterus) als Unterabteilungen der parenchymatösen Hepatitis gemacht. Alle diese Krankheiten zeichnen sich dadurch aus, dass der Farbstoff im Blute, falls er auftritt, nach HIYMANS V. D. BERGH gemischter Natur ist. Er gibt also die indirekte und die direkte Reaktion. Je nachdem die eine Komponente überwiegt, wird der Farbstoff die entsprechende Reaktion aufweisen. Ich habe auch in Wiesbaden schon ausgeführt, dass der Gallenfarbstoff im Blute z. Tl. ein retiniertes Bilirubin I ist, welches gleichzeitig mit einem Bilirubin II in Folge Rückstauung der Galle durch die toxisch geschädigten Gallenwege gemischt ist. Mir ist nun nicht bekannt, ob der Gallen-

farbstoff bei dem Gelbfieber im Blute schon nach der HIYMANS V. D. BERGHschen Methode untersucht ist, da ich die Literatur bei NOGUCHI, CASTELLANI u. a. nicht übersehe, bin ich vielleicht nicht auf dem Laufenden. Jedenfalls wäre es interessant, die Reaktion des beim Gelbfieber auftretenden Gallenfarbstoffes festzustellen. Nach allem müssen wir annehmen, dass es sich um einen Gallenfarbstoff mit gemischter Reaktion handelt. Es liegt also beim Gelbfieber ein Retentions- und ein Resorptionsikterus vor. Es wäre ja von besonderem Interesse, die Gallenwegsveränderungen besonders an den kleineren und kleinsten Gallenwegen kennen zu lernen. Bis jetzt ist, soweit ich sehe, nur über die Leberzellveränderungen genügend bekannt. Wenn aber ein gemischter Ikterus bestände, so würde das dafür sprechen, dass auch ein Resorptionsikterus beim Gelbfieber stattgefunden hat.

Die 3. Form der Gelbsucht, nämlich die des haemolytischen Ikterus, ist beim Gelbfieber nicht zu erwarten. Zwar kennen wir noch immer nicht den Erreger des Gelbfiebers. Ich kann mir aber nicht denken, dass dieser Virus, oder was es sonst sein mag, die Blutkörperchen so schädigt, dass ein rein haemolytischer Ikterus mit Erhöhung der indirekten Reaktion des Gallenfarbstoffes erfolgt. Die in den Leberzellen beschriebenen Veränderungen sprechen doch dafür, dass die Leber Hauptsitz der für die Gelbsucht in Betracht kommenden Bedingungen ist. Es kann sich also nur um die 2. oder 3. Form des Ikterus, um einen Retentionsikterus, wahrscheinlich auch um einen Resorptionsikterus handeln.

Es wäre sehr zu wünschen, wenn in den Gebieten, wo das Gelbfieber endemisch vorkommt, eine genaue Untersuchung des Gallenfarbstoffes im Blute stattfände. Daraus darf man dann gewisse Schlüsse auf die Schädigung der Leberzellen und die Schädigung der kleineren und grösseren Gallenwege ziehen.

Wenn ich die Frage der Gelbsucht beim Gelbfieber angeschnitten habe, so geschieht das vor allem, weil ich auch zahlreiche Fälle von Weilscher Krankheit, die mit dem endemischen Gelbfieber gemischt vorkommen, in Deutschland, in Holland usw. in reiner Form gesehen habe. Auch die Fälle von toxischem Ikterus, bei Schwangerschaft z. B., und von katharrhalischem Ikterus habe ich mehrfach gesehen, ich hatte aber keine Gelegenheit, die Reaktion des Gallenfarbstoffes bei den verschiedenen Erkrankungen im Blute zu ergründen. Soweit ich aus der Literatur ersehen konnte, kommt für all diese Fälle nur eine gemischte Reaktion in Frage. Immerhin würde auch hier Nachweis für das Gelbfieber von Bedeutung sein.

———■———

# REALIZAÇÕES DA COMISSÃO TÉCNICA DE PISCICULTURA DO NORDESTE

POR

Pedro de Azevedo e B. Borges Vieira

Da Comissão de Piscicultura do Nordeste

Com as estampas 3-8

Ao preclaro Prof. Rocha Lima que sempre nos honrou com a sua amizade estimulando-nos a prosseguir nos nossos trabalhos, dedicamos esta síntese das realizações da Comissão de Piscicultura do Nordeste.

## PESQUIZAS GERAIS

A zona de operações da Comissão Técnica de Piscicultura, organisação diretamente subordinada à Inspetoria de Sêcas, estende-se dentro dos limites oficialmente fixados para as atribuições dêste serviço federal, numa área total de 670.000 km², incluindo parte dos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagôas, Sergipe e Baía. Os característicos mesológicos de tão vasto território, foram necessariamente apreciados no seu conjunto, dentro das possibilidades oferecidas e abrangendo somente as questões básicas para uma identificação geral do ambiente.

Os primeiros estudos foram orientados para as questões de zoogeografia e fitogeografia, no intúito de estabelecer o comportamento da flora e fauna regionais em face das condições que definem a chamada zona sêca.

Na catalogação das espécies existentes, ficou constatado a pobreza geral da região, onde florescem apenas os especimens que pódem sobrepor à hostilidade do ambiente os seus recursos naturais de defesa. Nem por isso o aspecto zoogeográfico dessa extensa zona adquire peculiaridades próprias com o aparecimento de espécies tipicamente regionais.

Além de outros fatores de importância que condicionam o c l i m a nordestino, no sentido amplo do termo, o sistema potamográfico foi estudado com especial interêsse, principalmente no que respeita às consequências do regime a que estão sujeitos os rios e riachos que, com exclusão do rio S. Francisco, de caudal perene, sofrem as interrupções periódicas provocadas pelas estiagens. Os menos caudalosos põem a descoberto o leito primitivo completamente ressequido e os de corrente mais volumosa transformam o seu curso numa sucessão de poços distribuidos pelos locais de maior depressão. E' facil admitir

até que ponto a influência de modificações tão profundas do ambiente se faz notar na fauna aquática em geral e nos peixes em particular.

Finalmente, a matéria em que se identificam os objetivos da Comissão e vem porisso merecendo toda a atenção, é a que se refere às alterações mesológicas introduzidas com as obras artificiais de açudagem construídas para o armazenamento da água destinada a irrigação. Tais obras abrangem não só as pequenas e médias barragens das propriedades rurais, como tambem as grandes construções realizadas pela Inspetoria de Sêcas, sistematisadas nos vales dos rios Acaraú, Jaguaribe, Alto Piranhas e Baixo Piranhas ou Assú. Excluindo as obras de açudagem por cooperação, os açudes públicos já concluídos no Nordeste somam atualmente um total de 119, representando, em conjunto, a capacidade de um bilhão e oitocentos e setenta milhões de metros cubicos.

E' oportuno pôr em relêvo as condições excepcionalmente favoráveis para o desenvolvimento de um programa de piscicultura, criadas com as construções que a engenharia decidiu erguer para fazer face ao problema das sêcas no Nordeste. As transformações que vem sofrendo o sólo daquela vasta região, pontilhado de inumeros reservatórios de água, de todos os gráus de capacidade e área, emprestam-lhe um aspecto fisiográfico próprio, proporcionando recursos incalculáveis para a criação intensiva de peixes. As perspectivas econômicas de uma exploração racional de toda a grande massa de água armazenada justificam plenamente o incremento que merece e deve ser dado à piscicultura numa região que se tornou uma das mais indicadas para êste ramo da indústria animal. Neste particular, as previsões mais otimistas foram confirmadas pelos resultados já colhidos com a aclimação de dez espécies extranhas à região, selecionadas dentre as mais indicadas para a cultura intensiva, nas quais se enquadram as centenas de milhares de peixes lançados até o presente nos açudes do Nordeste.

## ESTUDOS DAS ÁGUAS

O primeiro passo para reunir os elementos indispensáveis à orientação futura da criação de peixes em larga escala foi dado com o estudo particularisado das coleções de água, sob o seu tríplice aspéto: físico, químico e biológico. Estando estabelecido que as pesquizas dessa natureza devem ser obrigatoriamente prolongadas afim de se estimarem com segurança o periodismo e as variações das condições linológicas, os primeiros trabalhos cingiram-se a um pequeno número de açudes, demorando-se, entretanto, por um período superior a 12 meses. As observações foram-se extendendo sucessivamente para as zonas onde fosse previsto um maior desenvolvimento das atividades da Comissão e os dados reunidos permitiram catalogar as condições fun-

damentais das águas nordestinas. No tocante às condições químicas, por exemplo, já estão traçados os limites das diferentes regiões do Nordeste de acôrdo com o teor salino das águas. Os exames realizados ressentem-se, porém, da discontinuidade a que foram sujeitos, em vista do grande número de coleções de água. Está-se cuidando atualmente de equipar e aparelhar devidamente a secção de Linologia de modo a permitir um estudo sistemático e periodico dos açudes mais importantes.

Em linhas gerais, as pesquizas sôbre as condições linológicas dos açudes obedecem o seguinte padrão:

*a)* — Condições gerais: Dados sôbre o sistema hidrográfico. Topografía e morfometría da bacia de água (área, volume, profundidade, conformação das margens, etc.).

*b)* — Condições físicas: Avaliação da temperatura e questões relativas (variações, periodismo, estratificação térmica). Medidas do gráu de transparência e turbidez.

*c)* — Condições químicas: Dosagem do anidrido carbônico, clorêtos, carbonatos, oxigênio e avaliação do pH. Curvas das variações dos fatôres químicos nas diversas quadras do ano.

*d)* — Condições biológicas: Registro de aquifauna e da aquiflora em geral e, particularmente, dos grupos que condicionam a produtividade das águas e cuja significação envolve questões de importância para a criação de peixes: alimentação, concorrência vital, inimigos naturais, defesa da criação, poluição das águas, etc. A primeira destas questões, relativa aos recursos alimentares, é considerada mais detalhadamente, abrangendo de preferência o estudo do *plancton* e de todos os organismos vegetais ou animais de pequeno pórte.

## ESTUDOS DAS ESPÉCIES

Os assuntos ligados à biología geral dos nossos peixes de água doce não lograram, até bem pouco tempo, merecer a devida atenção por parte dos naturalistas patrícios. O balanço da literatura nacional nêsse terreno demonstrou o pouco interêsse científico no estudo dos hábitos dos peixes brasileiros. Excluindo raros trabalhos especializados, a nossa ictiofauna tem sido considerada quasi exclusivamente como campo de pesquizas estrítamente zoológicas para identificação sistemática, se bem que, nêste particular, restem ainda muitas dúvidas a resolver. E' obvio acentuar a grande importância dêste problema para

uma organisação que se propõe o desenvolvimento racional de um programa de criação de peixes selecionados. Por êsse motivo, os trabalhos preliminares foram orientados para o esclarecimento perfeito de todos os aspectos da vida dos peixes, incluindo pesquizas de natureza tanto objetiva como experimental, sem estabelecer distinção entre espécies de muito ou pouco valor comercial. Estas indagações não ficaram limitadas aos exemplares da ictiofauna nordestina; estenderam-se aos peixes de outras bacias hidrográficas do país, tanto pela necessidade de estabelecer confrontos como de colher maiores ensinamentos. Os resultados obtidos constitúem elementos de incalculável valor para a orientação técnica das atividades do serviço permitindo uma noção mais exáta das particularidades biológicas dos nossos peixes. No registro de observações científicas da Comissão figuram mais de trinta mil protocolos de autopsias e dados ictiométricos de um grande número de espécies, além de farta documentação sôbre outros grupos zoológicos e questões biológicas em geral.

São os seguintes os capítulos estudados mais detidamente:

*a)* — Habitos e condições de vida: Comportamento dos peixes no "habitat" natural. Locais preferidos, sistemas de autodefesa. Habitos individuais e coletivos (cardumes). Processos de despesca.

*b)* — Alimentação: Anatomia do aparelho digestivo. Natureza do regime alimentar. Estudo qualitativo e quantitativo do cardápio de cada espécie. Alimentação da larva, do alevino e do adulto. Adaptação a regimes diferentes.

*c)* — Crescimento: Relação entre o índice de crescimento e a idade. Estudos das escamas (Lepidología) para gráfico das curvas de crescimento. Exigências naturais para o bom desenvolvimento.

*d)* — Reprodução natural: Evolução genital. Habitos da desóva espontânea. Proteção da prole. Índice do aproveitamento da cria em natureza.

*e)* — Reprodução artificial: Anatomía e fisiología dos orgãos sexuais. Hipofisação dos reprodutores. Doságem e tempo de ação do hormônio hipofisário. Hábitos da desóva provocada. Fecundação artificial. Embriogenía e ontogenía.

*f)* — Etiología das molestias mais frequentes: Parasitismo. Adaptação ao cativeiro.

*g)* — Concorrência vital: Estudo do equilibrio biológico das várias espécies no mesmo ambiente.

*h*) — Seleção: Espécies prolíficas e precoces. Condições exigidas para uma bôa cotação comercial. Propriedades nutritivas. Processos de industrialisação.

Dentre essas questões, um comentario especial deve ser reservado ao capítulo referente à reprodução artificial e que será exposto mais adiante, a proposito dos trabalhos práticos de criação.

Os estudos e experiências realisados pelo pessoal técnico da Comissão estão concretisados na lista de publicações que somam, até o presente, um total de 85 monografías e artigos diversos, classificados como segue, de acôrdo com a natureza do trabalho:

| | |
|---|---|
| Biología | 11 |
| Zoología | 19 |
| Botânica | 6 |
| Piscicultura | 26 |
| Hipofisação | 9 |
| Linología | 14 |
| Total | 85 |

Além do Catálogo Biológico dos peixes fluviais do Nordeste Brasileiro, em organisação, é licito mencionar tambem que, em material zoológico e botânico coletado pela Comissão, foram identificados 57 espécies novas para a Ciência.

### ACLIMAÇÃO DAS ESPÉCIES

As espécies de peixes rotulados como recomendáveis para o povoamento das águas nordestinas são selecionados de acôrdo com certos requisítos essenciais que podem ser assim resumidos: *a)* desenvolvimento rapido atingindo pêso e tamanho apreciáveis de dois a três anos de idade; *b)* reprodução precoce para garantia da repopulação constante; *c)* carne de bom paladar que lhe dê cotação comercial vantajosa; *d)* despesca facil proporcionada pelos seus hábitos de vida; *e)* possibilidades de industrialisação fornecidas pelas propriedades da carne; *f)* criação fácil, dispensando ou reduzindo a necessidade de arraçoamento artificial.

As espécies foram primeiramente selecionadas entre as existentes na região e, a despeito do número reduzido das que possam satisfazer pelo menos em parte, as condições exigidas, os serviços de peixamento foram iniciados com as seguintes: "curimatã" *(Prochilodus argenteus)*, "piáu" *(Leporinus* sp.), "cangatí" *(Trachycorystes striatulus)*.

Além das espécies regionais, são utilisadas as espécies estranhas obtidas nas bacias hidrográficas visinhas: rios Parnaíba, São Francisco e Amazonas. A rigor, as espécies do rio São Francisco não devem ser consideradas como estranhas, pois seu trecho final corre dentro da região sêca. Tratando-se porém do único rio perene do Nordeste, a distribuição geográfica de determinados grupos ficou limitada às suas águas, sendo de notar as ótimas qualidades de um grande número de espécies que abriga.

De acôrdo com a procedência, é a seguinte a lista das espécies ditas estranhas, que têm figurado nas atividades da Comissão, seja nas fichas de peixamento, seja nos trabalhos recentes de aclimação: Do rio São Francisco: "pescada" *(Pachyurus francisci)*, "mandi" *(Pimelodus clarias)*, "pacú" *(Myleus* sp.), "piáu preto" *(Leporinus* sp.), "pirá" *(Conorhynchus conirostris)* e "curimatã-pacú" *(Prochilodus* sp.). Do rio Amazonas: "pescada" *(Pachyurus* sp.) abrangendo duas variedades: cacunda e branca; "apaiarí" *(Astronotus ocellatus)*; "tucunaré" *(Cichla ocellaris)*; "pirarucú" *(Arapaima gigas)*. Do rio Parnaíba foram aproveitadas somente algumas espécies para trabalhos puramente experimentais, afim de completar o estudo da produtividade dêste rio. As dificuldades de transporte não permitiram, até o presente, maior desenvolvimento das atividades da Comissão nas regiões limitrofes àquela bacia. Entretanto, depois de afastado êsse inconveniente, o rio Parnaíba constituirá um valioso recurso para o provimento de "stocks" de peixes que se destinarem à distribuição nos açudes visinhos.

Exporemos, a seguir um ligeiro comentario sôbre a significação econômica de algumas das espécies mencionadas:

Curimatã — *(Prochilodus argenteus)*. Espécie iliófaga, generalisada a quasi todos os rios e riachos nordestinos e presente, por difusão natural, em numerosos açudes. As dimensões maximas são variaveis de acôrdo com os recursos de cada biotopo. Já se registraram exemplares de 1.600 grs. de peso e 48 cms. de comprimento. E' peixe apreciado pelas pessôas de paladar pouco exigente a despeito do grande número de espinhas e do gosto tipico de lôdo resultante do seu regime alimentar. Presta-se admiravelmente ao trabalho de hipofisação, tanto pela facilidade de reação ao estímulo da hipofíse, como pelo grande rendimento que se obtem com um número reduzido de reprodutores. O número de óvos correspondentes a uma única femea atinge frequentemente a um milhão.

Piáu — *(Leporinus* sp.). Espécie menos difundida do que a precedente à qual se equipara no que respeita às propriedades culinarias.

O seu desenvolvimento não atinge, porém, as mesmas dimensões. Salienta-se tambem pelas facilidades de hipofisação e criação.

Cangatí — *(Trachycorystes striatulus)*. Peixe de couro, de regime insetivoro, de porte reduzido (25 cms.) e, apezar disso, mais apreciado pelas qualidades mais finas para o preparo. Um detalhe de sua biologia veiu facilitar em grande parte os trabalhos para a sua reprodução artificial: é sabido que as femeas já guardam no ventre certa quantidade de esperma desde meses antes da epoca da procriação. Como consequencia, nos trabalhos de hipofisação, é dispensado o concurso dos machos. A criação de larvas e alevinos não encontra grandes dificuldades.

Curimatã-pacú — *(Prochilodus* sp.). Os mesmos conceitos emitidos para a curimatã comum no Nordeste valem para sua congenere, a curimatã-pacú do rio São Francisco. Note-se, porém, que entre as qualidades que distinguem esta última como um dos peixes mais recomendaveis para a difusão é o acentuado desenvolvimento que acusa, ultrapassando de 60 cms. de comprimento e 8 quilos de peso. A curimatã-pacú tem figurado em quotas apreciaveis nos trabalhos de peixamento da Comissão.

Mandí — *(Pimelodus clarias)*. Espécie do grupo de peixes de couro, muito gabado pelos apreciadores do bom pescado. Alcança em média 50 cms. de comprimento.

Pacú — *(Myleus* sp.). Os exemplares desta espécie incluem-se entre os peixes de grande porte do rio São Francisco, onde chegam a medir 60 a 70 cms. de comprimento, e 10 a 12 quilos de peso. O paladar de sua carne e a especialisação do seu regime alimentar herbívoro e frugívoro recomendam-no especialmente para os açudes de quantidade apreciavel de gramineas e onde sejam frequentes as grandes vazantes.

Pescada-cacunda — *(Pachyurus* sp.). Da ictiofauna amazonica, a pescada é o peixe mais nobre até agora adaptado no Nordeste. Quanto ao gosto da carne, a pescada satisfaz os paladares mais exigentes. Acrescente-se tambem a precocidade da reprodução, criação natural facilima e desenvolvimento rapido (45 cms. de comprimento e 1.700 grs. de peso). E' interessante notar que nos açudes nordestinos a pescada atingiu dimensões maiores do que os exemplares tidos como bem desenvolvidos que foram capturados por ocasião dos estudos no rio Amazonas. Os resultados da sua aclimação foram surpreendentes, pois dezenas de milhares de pescadas já distribuidas pelos açudes provêm de um lote apenas de 25 reprodutores trazidos do Pará em fins de 1935.

P e s c a d a - b r a n c a — *(Pachyurus* sp.). Do mesmo genero que a precedente, a pescada branca, que foi recentemente aclimada, distingue-se por minucias de morfología e, sobretudo, pelo tamanho mais pronunciado a que póde atingir. E' de esperar, portanto, no caso do mesmo exito, um resultado ainda mais vantajoso.

A pescada do rio São Francisco equipara-se em tudo às duas congeneres amazonicas.

A p a i a r í — *(Astronotus ocellatus).* O que torna êste peixe particularmente indicado para os trabalhos da criação natural é a facilidade da sua multiplicação, independente de condições meteorologicas. Acresce ainda, para segurança da produção, a cuidadosa vigilancia dispensada pelos pais às pequenas larvas, defendendo-as contra a aproximação de qualquer inimigo. Apesar de sua aclimação recente, o apaiarí já está bastante difundido no Nordeste.

P i r a r u c ú — *(Arapaima gigas).* Espécie muito popular, conhecida como uma das curiosidades amazonicas, em virtude, principalmente, das grandes dimensões que chega a atingir, pois muitas vezes ultrapassa de 2 metros de comprimento. A sua carne presta-se muito bem ao preparo industrial e costuma ser vendida no Amazonas, Pará e demais Estados do Brasil, em mantas salgadas e sêcas ao sol, processo de conservação ainda primitivo.

As observações procedidas por ocasião das últimas desóvas verificadas no Museu Emilio Goeldi do Pará vieram esclarecer algumas questões ainda obscuras quanto à biología do pirarucú, e orientaram os primeiros trabalhos de criação artificial de suas larvas.

O primeiro transporte dêste peixe, efetuado por via maritima, em agosto de 1939, consistiu em exemplares jovens, de comprimento médio de 25 cms. Na última verificação (junho de 1940), o crescimento atingido no açude-viveiro onde foram colocados foi de 1,29 ms.

Posteriormente foram transportados por via aérea cerca de 4.000 larvas de 5 dias de idade. Diversos problemas referentes à criação artificial desta espécie foram resolvidos pela observação dêste último lote, mantido atualmente no Pôsto de Tauápe.

T u c u n a r é — *(Cichla ocellaris).* Outra espécie amazonense recentemente transportada para aclimação é o tucunaré, peixe que se destaca entre os grandes exemplares do nosso maior rio. Sua principal qualidade é o ótimo sabor da carne. Entretanto, por se tratar de espécie carnívora, a sua criação só se recomenda para águas confinadas, onde já existem espécies tanto ou mais carnivoras do que ela.

A reprodução espontânea do tucunaré, em cinco gerações sucessivas, verificada ultimamente em um açude do Ceará, constitue a posi-

tividade do "test" mais seguro sôbre a sua adaptabilidade às águas nordestinas.

P i r á — *(Conorhynchus conirostris)*. Êste grande silurideo do rio São Francisco apresenta uma particularidade curiosa que constitue, aliás, a sua melhor recomendação para criação natural: o contraste entre o seu desenvolvimento, que alcança pouco menos de um metro, e o regime particularmente reduzido, pois se alimenta dos pequenos organismos bentonicos: vermes, microcrustaceos, moluscos, etc.

## PRÁTICA

### CRIAÇÃO

O objetivo maximo da Piscicultura é a criação de peixes destinados à alimentação do homem. Para tanto ela propõe-se desenvolver racionalmente êste ramo de produção animal, multiplicando as espécies mais preciosas e favorecendo suas condições de existência, tendo em vista uma remuneração vantajosa. E' evidente que a cultura do peixe exige, preliminarmente, a existência de reservatórios de água apropriados para a exploração e, nêste particular, já foram assinaladas as facilidades incomuns proporcionadas pelos numerosos açudes do Nordeste. Resta examinar os meios mais indicados para promover o enriquecimento das suas águas, povoando-as com espécies selecionadas.

O processo mais simples para a criação natural resume-se em distribuir no açude certo número de peixes escolhidos, destinados à reprodução, e protegê-los durante o tempo necessário para garantir a sua multiplicação espontânea. Entretanto nem todas as espécies se prestam a serem criadas por êsse sistema, pois grande número delas não se reproduz naturalmente em águas confinadas. Não obstante, a solução não deixa de ser particularmente cômoda quando é possivel utilisar espécies indicadas, isto é, as que se reproduzem, mesmo em cativeiro; nêste caso está a "pescada-cacunda" do Amazonas *(Pachyurus* sp.), da qual foi transportado para o Ceará, em fins de 1935, um lote de 25 reprodutores. Do único açude onde foram colocados, já se capturou, até o presente, uma descendência de cêrca de 35.000 exemplares que serviram para nova distribuição.

Do ponto de vista econômico, nem sempre a criação natural dá margem a uma grande produção, pois além do pequeno índice de aproveitamento que se verifica por ocasião da desóva, em geral êste fenômeno obedece a um ciclo anual regulado pelas condições meteorológicas. Em conclusão, os peixes que proporcionam um resultado mais satisfatório, quando abandonados aos recursos naturais da multiplicação, são aqueles cuja quadra de reprodução se repete duas ou três

vezes ao ano, independentemente de condições climáticas. Um exemplo tipico é o do "apaiarí" ou "acará-assú" do Amazonas *(Astronotus ocellatus)* que, mesmo em ambientes reduzidos, desóva varias vezes no ano.

As coleções de água de grande capacidade, das quais existem no Nordeste numerosos exemplos (açudes Lima Campos, São Gonçalo, General Sampaio, Forquilha, Joaquim Távora, etc.) exigem, por seu lado, um peixamento intensivo de modo a se conseguir, no mínimo praso possivel, um resultado compensador.

As dificulades até aqui expostas quanto á distribuição de peixes em larga escala, visando a criação natural em todos os açudes da região, serão afastados se o provimento dos exemplares necessários para o peixamento ficar garantido, pela criação artificial, em Postos dotados de instalações apropriadas e com uma capacidade de produção suficiente. Em outros termos, a solução está em obter uma quantidade de óvos fecundados de espécies escolhidas e criar artificialmente a larva e o alevino até o tamanho suficiente para serem distribuidos com o máximo de segurança. O problema se desloca naturalmente para uma nova questão: obter óvos fecundados em grande quantidade. O recurso de colhê-los em natureza, imediatamente após a desóva natural dos peixes, nem sempre é praticável. Foi necessário procurar um método que permitisse forçar a desóva das espécies desejadas em aquários especiais, de modo a colocar à disposição do técnico uma abundante produção de óvos afim de prosseguir na sua criação até a fase de alevino. A hipofisação dos reprodutores, que passaremos a comentar em resumo, foi o método encontrado pela Comissão de Piscicultura que realisou todos os estudos e experiências até esclarecer, em definitivo, os detalhes da aplicação da hipófise para a desóva provocada dos peixes.

## HIPOFISAÇÃO DOS REPRODUTORES

Inicialmente é necessário pôr em relêvo as circunstâncias que, em natureza, acompanham a reprodução dos peixes nordestinos e cuja ocorrência é quasi generalisada à ictiofauna da região neotrópica.

A quadra de reprodução dos peixes coincide com as chuvas que marcam o início da chamada estação de "inverno", em fevereiro ou março e se prolonga até abril ou maio. Durante os outros meses do ano, desde a última desóva, os orgãos genitais dos peixes, de ambos os sexos, vão sofrendo, gradativamente, as transformações que caracterisam a "maturação". Objetivamente, os característicos que assinalam a "maturação sexual", fenômeno que culmina com as primeiras precipitações pluviais, podem ser verificadas pela compressão manual do ventre dos peixes. No macho, o esperma escôa com facilidade pelo

orifício genital, tendo o aspecto leitoso típico e, pelo exame microscopico, distinguem-se espermatozoides de bôa vitalidade que se põem em movimento em contáto com a água. Na fêmea, os óvulos fluem abundantemente, separam-se logo que sejam mergulhados na água e, ao fim de poucos minutos, devido à bôa permeabilidade da cápsula externa, acusam um apreciável aumento de volume provocado pela hidratação.

Quando atingem, pois, a fase de maturação sexual, os peixes estão aptos a reagir ao estímulo das primeiras quédas de chuva, sofrendo um impulso natural que os impele a subir os rios, transpor as barreiras da sua desembocadura nos açudes, escalar cachoeiras, numa tendência instintiva para procurar "águas novas" e locais propicios para desóva. Quando, por qualquer motivo, as chuvas se demoram e irrompem bruscamente, a subida dos peixes se faz em massa, assumindo proporções de um espetáculo devéras curioso, denominado pelos indigenas, "piracema".

Entre as circunstâncias que precedem a desóva própriamente dita, já podemos distinguir o f a t o r r e m o t o referente à maturação genital prévia e o f a t o r p r ó x i m o representado pelas quédas de chuva. A essencia do estímulo final que constitue o f a t o r i m e d i a t o ainda está pouco definida (certos autores atribuem à ionisação) e o seu efeito se faz notar na intimidade do organismo dos reprodutores, provocando uma descarga de hormônio hipofisário que os induz à procura mutua dos sexos e à realisação da desóva.

A analise dos fatores que determinam a reprodução dos peixes, na natureza, levam-nos a qualificá-la como um episodio imprevisivel, de curta duração e sujeito a toda sorte de incertezas. E' evidente o interêsse do técnico em conseguir um método que lhe facultasse controlar diretamente o áto da reprodução, tendo em vista, de um lado, a inteira impraticabilidade de um aproveitamento compensador da criação quando entregue aos recursos naturais de multiplicação e, por outro lado, a impossibilidade correntemente verificada, pelo menos na maioria das espécies, de se obter a desóva espontânea, quando em cativeiro, em ambientes reduzidos.

Para a realisação dêste propósito, o objetivo das primeiras tentativas foi substituir o estímulo do f a t o r i m e d i a t o, sob a ação do qual se processa uma descarga hormonal, pela introdução artificial, no organismo dos reprodutores, de uma determinada dose de extrato hi-

pofisário, obtido de outros peixes, provocando um aumento brusco da reserva de hormônio com o fim de induzir á desóva nos ambientes desejados. De início, ficou comprovada a eficiência dêsse recurso, pelas modificações observadas na estrutura dos orgãos genitais.

Com o prosseguimento das experiências, chegou-se a um resultado satisfatório, sendo possivel obter a desóva, muitas vezes com prazo marcado, em aquário especialmente destinado a êsse fim. A principal vantagem do processo é permitir uma proteção imediata, com aproveitamento quasi integral dos óvos, sem mencionar a possibilidade de se pôr em prática a fecundação artificial, isto é, a mistura artificial dos elementos sexuais obtidos pela compressão do ventre dos reprodutores.

A hipofisação dos reprodutores constitúe, atualmente, uma operação de rotina dos trabalhos da Comissão no que respeita às espécies mais frequentemente utilisadas na prática. E' preciso acentuar, porém, que nem todas se comportam de maneira idêntica quando submetidas a êste método que, evidentemente, não póde ser generalisado aprioristicamente. Resta estender cada vez mais a sua aplicação, tendo em conta que, para cada espécie, são exigidas novas observações e experiências prévias.

## CRIAÇÃO ARTIFICIAL

Incubação dos óvos: — A primeira fase dos trabalhos de criação artificial é a incubação dos óvos obtidos pela desóva provocada ou pela fecundação artificial. Antes que os processos de incubação, atualmente adotados pela Comissão, fossem ampliados e postos em uso corrente, varios tipos de aparelhagens foram experimentados com o intúito de apurar os detalhes do plano que oferecesse o máximo de garantia e proteção.

As características dos dois sistemas preferidos: tanques e jarras, são ditadas pelas peculiaridades estruturais das duas categorías de óvos: flutuantes e adesivos. Cada um dos tanques tem uma capacidade aproximada para 5.000 óvos e possue, além de uma instalação especial para captação e escoamento da água corrente, um dispositivo proprio que permite a coléta rapida das larvas sem os inconvenientes da coléta manual. As jarras com capacidade para 50.000 óvos tambem são construidas com o mesmo objetivo.

Durante o tempo da incubação, que, para os nossos peixes, raramente ultrapassa de 35 horas, os óvos são objétos de uma atenta vigilancia afim de garantir o suprimento constante da água, evitar as variações bruscas de temperatura, retirar os óvos gorados, etc.

A incubação termina com a eclosão das larvas, que devem permanecer ainda certo tempo no tanque, até que adquiram movimentos proprios de natação.

Criação das larvas: — Dos tanques de incubação as larvas são transferidas para os tanques de estágio, com capacidade de 15.000 larvas cada um. A alimentação, que se inicía nesta fase, resume-se, para a totalidade das espécies, no consumo dos micro-organismos do *plancton,* do qual sempre dispomos de uma reserva suficiente, mantida em locais apropriados. Denomina-se *plancton,* de um modo geral, o conjunto de organismos aquáticos, de porte reduzidissimo, que vive ao sabor das correntezas. E' constituido quasi exclusivamente de Protozoarios, Microcrustaceos, Rotiferos e Algas.

Os tanques de criação de larvas são de construção simples, de paredes e fundo lisos, e dotados de um dispositivo que permita o escoamento rapido. A água é renovada com frequencia e tem-se o cuidado de distribuir na sua superficie algumas plantas flutuantes que servem de abrigo às larvas. Alimentação planctonica farta e repetida, e a vigilancia contínua, completam os cuidados para esta fase da criação.

As larvas permanecem nos tanques de estágio um tempo tão prolongado quanto possivel, em média de 10 a 15 dias, até que seja necessário enriquecer a ração com alimentos mais variados, além do plancton e que são colhidos de acôrdo com as exigencias de cada espécie. Nesta emergencia as larvas, que então já são designadas por alevinos, necessitam de condições ambientes mais proximas das naturais.

Criação de Alevinos: — Os tanques de alevinos são de capacidade variavel (1.000 a 5.000 exemplares), de paredes lisas e de fundo coberto de uma bôa camada de lodo. Vegetação flutuante e submersa em quantidade suficiente para constituirem locais de refúgio; ambiente biologicamente produtivo, isto é, com recursos alimentares naturais e água corrente ou frequentemente renovada, são os fatores levados em conta para o preparo dos tanques. Entretanto é preciso notar que, em tais circunstancias, os locais de criação constituem ambientes propícios para o aparecimento de certos organismos aquáticos que pódem tornar-se prejudiciais, pelos seus habitos de predação ou agressão, aos alevinos. Nesta classe de inimigos naturais estão incluidos habitualmente certas ordens de insetos de vida aquática parcial ou completa: *Odonata, Hemiptera* e *Coleoptera.* Cada um destes grupos foi objéto de uma observação cuidadosa afim de se acertarem as medidas mais eficazes para evitá-los ou combatê-los.

A questão da alimentação já se torna complexa, pois é preciso atender aos diferentes regimes de cada espécie e estudar o processo de arraçoamento mais adequado.

A criação artificial dos alevinos prolonga-se até que os peixes adquiram um desenvolvimento suficiente para se habilitarem a cuidar da propria defeza e sustento no ambiente natural para onde se destinam. Em geral a distribuição dos alevinos criados no Pôsto de piscicultura é realisada com exemplares de 3 a 8 centimetros de comprimento. Excluem-se, porém, as espécies de grande porte, as quais, ainda em fase de alevinos, alcançam comprimento apreciavel (10 a 20 cms.).

DISTRIBUIÇÃO

Os trabalhos de peixamento dos açudes nordestinos a cargo da Comissão de Piscicultura obedecem a uma orientação essencialmente diversa da seguida por organisações congeneres estrangeiras, entre as quais mencionamos o Bureau of Fisheries do Departamento de Comércio dos Estados Unidos e a Dirección de Ganaderia do Ministério da Agricultura da República Argentina. Para os serviços de distribuição de peixes, êsses orgãos técnicos de fomento da piscicultura utilizam de preferência óvos embrionados das espécies desejadas. E' evidente que tal critério foi ditado pelas particularidades biológicas que distinguem os peixes regionais, além de outras circunstâncias proprias de cada país (época de reprodução bastante demorada, evolução embriogenetica extremamente longa, número reduzido de espécies, facilidades de transporte, etc). Por êsse motivo as estatísticas daqueles serviços, principalmente do norte-americano, mencionam cifras que orçam por milhões, referindo-se, porém, a óvos embrionados. As condições do nosso meio não permitem procedimento identico, apesar dos transportes, limitado apenas aos óvos, ser muito mais facil e, aparentemente, muito mais rendoso, pois poderiamos tambem obtê-los aos milhões. Entretanto a distribuição em massa, nos açudes, de uma grande produção de óvos embrionados, constituiria uma tentativa de resultados muito duvidosos, pois os inumeros fatores de destruição, nas primeiras fases da vida, principalmente na região tropical, são de ordem a frustar os objetivos de qualquer iniciativa dessa ordem.

Em compensação, a distribuição de peixes juvenís, obtidos seja pela criação artificial, seja pela captura nos rios visinhos, oferece outras vantagens e garantias que justificam plenamente a orientação adotada pela Comissão. Compreende-se perfeitamente que a distribuição

de exemplares juvenís não acuse cifras tão avultadas como os que seriam atingidos com a utilisação de óvos, pois os peixes exigem aparelhagem maior e mais complexa e transportes pouco demorados, em contraposição com os longos trajétos a percorrer e com as condições de transito nem sempre favoráveis do vasto territorio ocupado pelos Estados do Nordeste.

O povoamento dos açudes com espécies selecionadas foi iniciado praticamente em 1938. Dessa data até o presente, os exemplares distribuidos somam um total de 407.700 peixes. Até 1938 os serviços desta natureza tiveram um fim puramente experimental para o esclarecimento dos métodos mais adequados para o transporte. O peixamento dos anos de 1934 a 1937, inclusive, atingiu um total de 54.000 exemplares, que perfaz com as cifras correspondentes aos anos de 1938 a 1940 (junho) uma soma total de 461.700 peixes.

E' preciso notar que as espécies do rio Amazonas que figuram na distribuição referem-se a exemplares obtidos depois da sua aclimação e reprodução espontânea nos açudes-viveiros para onde foram primeiramente transportadas.

O número de açudes peixados até o presente compreende: 90 açudes públicos e 418 açudes particulares, num total de 508.

o ———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 3

Fig. *A* — Piáu preto — (*Leporinus* sp.). Espécie originaria do rio S. Francisco.
Fig. *B* — Curimatã-pacú — (*Prochilodus* sp.). Espécie originaria do rio S. Francisco.

### Estampa 4

Fig. *C* — Pescada cacunda — (*Pachyurus* sp.). Espécie originaria do rio S. Francisco.
Fig. *D* — Pescada branca — (*Pachyurus* sp.). Espécie originaria do rio Amazonas.

### Estampa 5

Fig. *E* — Pirarucú juvenil — (*Arapaima gigas*). Espécie originaria do rio Amazonas.
Fig. *F* — Tucunaré — (*Cichla* sp.). Espécie originaria do rio Amazonas.

### Estampa 6

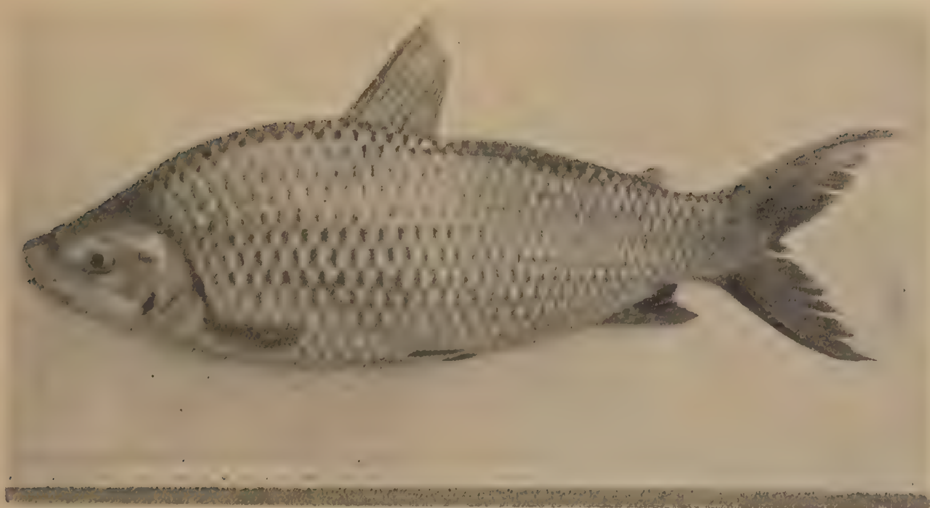
Fig. *G* — Tanques para incubação de óvos. Pôsto de Fortaleza.
Fig. *H* — Tanques para criação de alevinos. Pôsto de Fortaleza.

### Estampa 7

Fig. *I* — Pavilhão do laboratorio do Pôsto de Fortaleza.

### Estampa 8

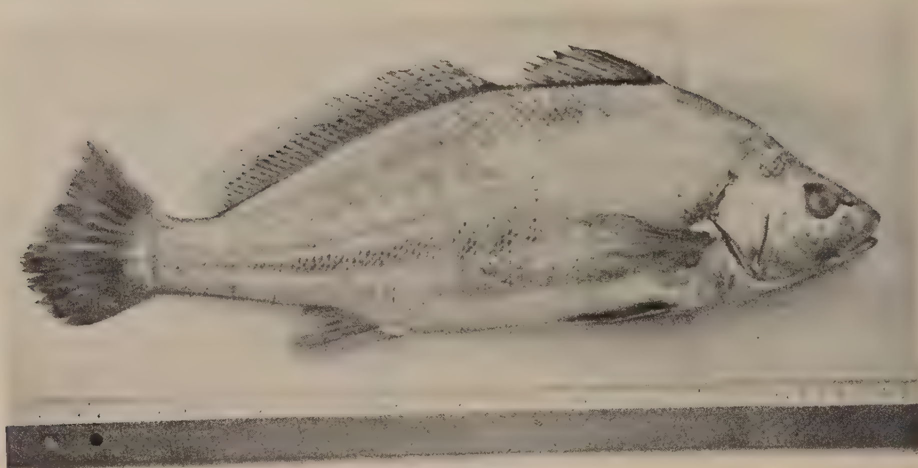
Figs. *J-L* — Tanques do Pôsto anexo de Tauápe.



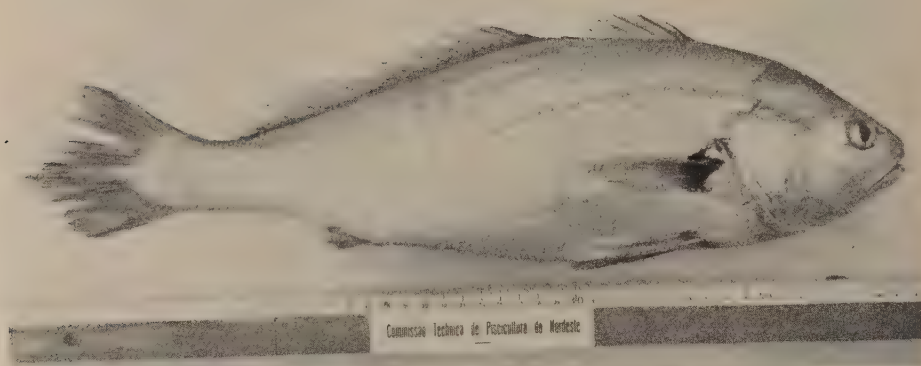
*A*



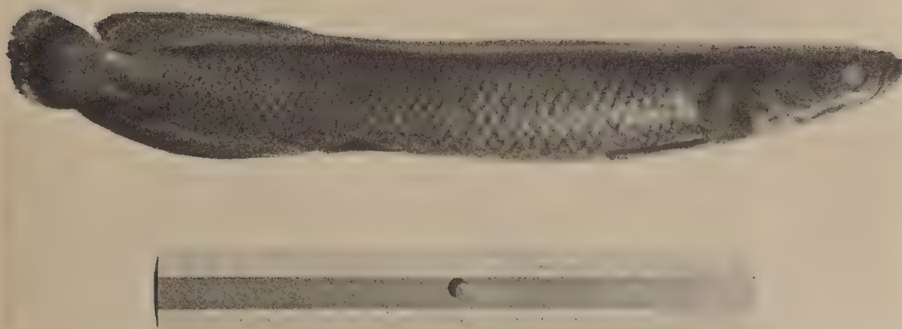
*B*



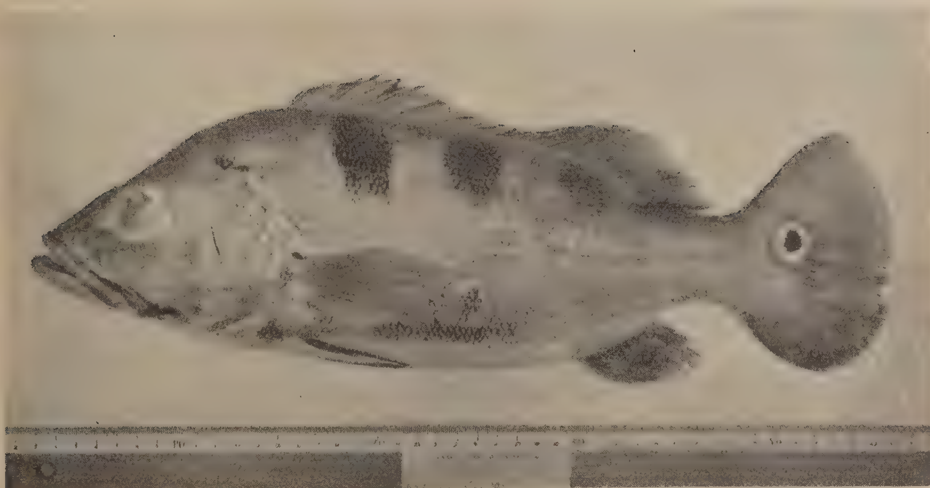
C



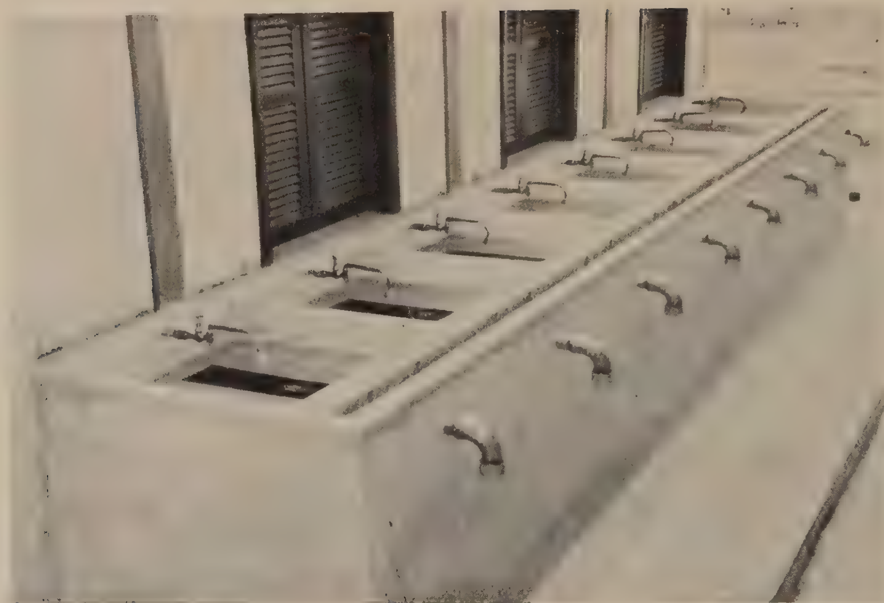

D



*E*



*F*

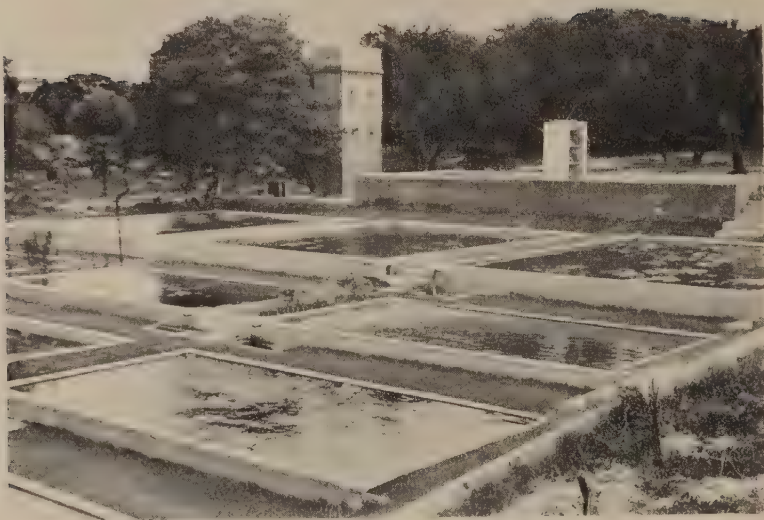


*G*



*H*





J



L

# INCUBAÇÃO DE OVOS DE SERPENTE NO LABORATORIO

POR

Fernando Paes de Barros e Alcides Prado

Do Instituto Butantan, S. Paulo

Com as estampas 9-10

Quando, em 1923, um de nós chefiava o serviço de opoterapia, ora extinto no Instituto Butantan, teve a atenção despertada pela grande quantidade de ovos de cobra que se perdiam. Eram eles postos no serpentario das chamadas não venenosas, em cujas proximidades se encontrava o pavilhão em que estava instalado aquele serviço — a Secção de Quimio e Opoterapia. Tais ovos, invariavelmente, murchavam e secavam sem germinar, logo depois de postos; daí a idéia de estudar as causas dessa circunstancia e as tentativas então realizadas no sentido de conseguir a sua evolução.

Naquela época, nada foi obtido; afigurou-se-nos necessaria a observação de uma postura normal, pelo animal em liberdade, no seu habitat, pois acreditavamos, já naquela ocasião, que a postura em cativeiro, realizada à superficie do solo, ao sol ou entre ervas rasteiras, muito diferia da que é realizada pelas cobras soltas, em liberdade, com completa satisfação de todas as suas exigencias biologicas.

Por muitos anos, entretanto, não se nos deparou a oportunidade para essa observação, que só agora alcançámos, no Horto Oswaldo Cruz, dependencia da Secção de Botanica Medica de Butantan. Ali, verificámos que para a postura dos ovos, as cobras procuram um terreno permanentemente humido e de profundidade variavel — provavelmente com a temperatura media local — garantindo, ao mesmo tempo, a humidade para evitar a dissecação do ovo e o calor preciso ao desenvolvimento blastodermico e seus sequentes, até desenvolvimento completo do embrião.

Fundados nessas lições da natureza, procuramos os meios de criar um ambiente, o mais aproximado possivel do observado e escolhido pelo animal em liberdade.

Assim, pensamos numa camara humida, confecionada com aparelhos comuns, que possuissemos em nossos laboratorios; lembramo-nos de utilizar um dissecador comum para acido sulfurico ou cloreto de calcio.

No fundo de um desses aparelhos, medindo 11 centimetros e meio de diametro interno, colocamos certa porção de agua e, mergu-

lhado nesta, um cristalizador, com diametro de 8 centimetros e meio (3 centimetros menos que o diametro do dissecador) cheio de areia humida, serviu de incubador para uma ninhada de 8 ovos de *Liophis undulatus* (WIED).

Introduzidos os ovos nessa areia humida, de fórma a ficarem completamente cobertos por ela, no dia 29 de setembro de 1939, tapámos o dissecador com a sua campanula propria e, na tubulúla superior desta, em logar da torneira propria, colocamos, para obturá-la, um pequenino cristalizador de vidro que, fechando o orificio, permitia, todavia, uma relativa renovação de ar e regularização da pressão do vapor dagua, no interior do aparelho.

Na camara humida, assim improvisada, permaneceram os ovos, sempre observados, até o dia 11 de janeiro de 1940, quando, pela manhã, ao examiná-la, tivemos a agradavel surpresa de encontrar uma esperta cobrinha, provavelmente nascida durante a noite.

Retirada esta e removida a areia superior, de fórma a pôr os ovos a descoberto, como sempre faziamos, para observação, encontrámos a casca vasia, de onde saíra aquele primeiro filhote, e um outro ovo furado num dos polos. Era um pequeno orificio, a principio circular, de ½ mm. de diametro, e depois radiante, por tres fendas, por onde se escoava, em jactos intermitentes, uma substancia gelatinosa, transparente, perfeitamente comparavel à clara do ovo das aves. Durante uma hora e quarenta minutos mantivemos em observação esse ovo, que é o mesmo da fotografia junta, certos de que, pelo aumento, esse orificio daria saída à cobrinha. Mas, tal fato não se deu; depois de algum tempo, outro furo começou a ser feito lateralmente, de forma linear em arco, no sentido do maior diametro do ovo. E foi por esta ultima abertura que a cobrinha se libertou do seu involucro.

A principio, como é natural, pensámos que essa dupla abertura fosse regra geral no "picar" dos ovos: a pequenina cobra prepararia primeiro aquele furo polar, como uma valvula — escoadouro para o liquido acima descrito; depois da saída deste, abriria, lateralmente, a porta para a sua libertação. Mas a observação dos demais ovos mostrou-nos claramente o nosso engano, pois em nenhum outro verificámos essa abertura prévia. Concluimos, ao contrario, que o fato em coincidencia com a nossa primeira observação, foi uma exceção, um "erro" cometido pelo animalzinho, talvez devido à posição do ovo, forçando a sua posição, e daí a saída da substancia liquida em jactos intermitentes, que observamos, e atribuimos aos movimentos executados pela cobrinha para se pôr em posição apropriada.

Dos 8 ovos incubados pela fórma descrita, no aparelho improvizado e que se vê nas fotografias juntas, obtivemos 7 filhotes; um ovo não evoluiu.

A fotografia do ovo está ampliada para o dobro, mais ou menos; suas dimensões são 16 x 23 mm.

(Entregue para publicação em 18-II-40).

——o——



Fig. *A* — Detalhe do aparelho incubador

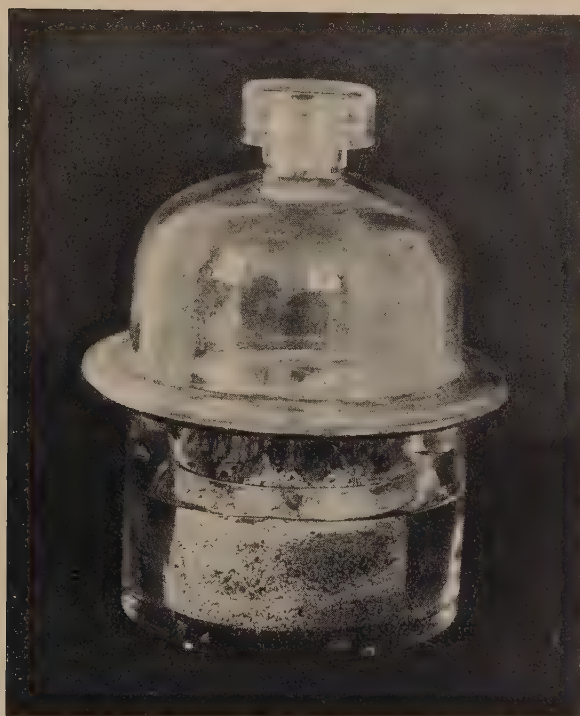


Fig. *B* — Aparelho incubador montado

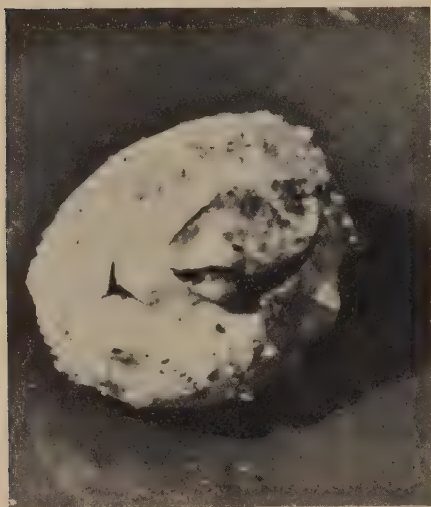


Fig. *C* — O ovo duplamente perfurado

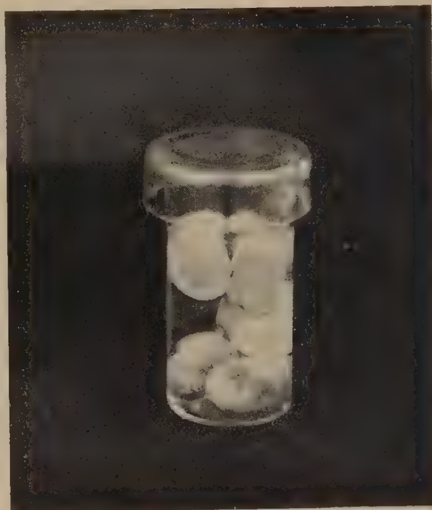


Fig. *D* — As cascas dos ovos



Fig. *E* — As cobrinhas nascidas no incubador

# SÔBRE A DISSOCIAÇÃO DO COMPLEXO LIPOIDE-REAGINA SIFILÍTICA EM SOLUÇÃO CONCENTRADA DE NaCl

POR

O. Bier & E. Trapp

Do Instituto Biologico de S. Paulo

BIER (1) mostrou, em 1931, que nas soluções concentradas de NaCl, o "ótimo de aglutinação" se desloca para a esquerda, isto é, para as mais altas concentrações de sôro. Esse fato foi interpretado admitindo-se que, em presença de um excesso de electrolito, a afinidade do antígeno para o anticorpo diminúe.

As pesquisas mais recentes de HEIDELBERGER, KENDALL & TEORELL (2) (1936) corroboraram essa interpretação: êstes aa. mostraram, com efeito, que a quantidade de anticorpo precipitada por uma quantidade fixa de polisacarídeo do pneumococo tipo III, decresce á medida que se aumentam as concentrações de NaCl, e que êste efeito não é devido a uma solubilização do precipitado, mas a uma diminuição da quantidade de anticorpo combinada.

Em virtude das evidências acumuladas em favor da tese que a reação de Wassermann é uma reação antígeno-anticorpo lipoide e que as reações de floculação na sífilis têm essencialmente o mesmo mecanismo das reações de aglutinação e precipitação específicas (2), procurámos verificar como se comportava o floculado lipoide-reagina sifilítica nas soluções concentradas de NaCl: em tais condições, o complexo polisacarídeo-anticorpo pneumocócico se dissocia permitindo a obtenção de soluções muito purificadas do anticorpo (4).

A tres tubos de hemólise contendo 2 cc. de sôro sifilítico inativado adicionam-se:

a) 0.5 cc. de antígeno de floculação de Eagle 1 + 1.3.
b) 0.25 cc. de antígeno de floculação de Eagle 1 + 1.3.
c) 0.1 cc. de antígeno de floculação de Eagle 1 + 1.3.

Agita-se bem e deixa-se durante a noite na geladeira. No dia seguinte centrifuga-se energicamente e lavam-se os precipitados 4 vezes com água fisiológica gelada. O último líquido de lavagem é guardado para contrôle.

Os sedimentos são suspensos em 0.2 cc. de NaCl 10%. Agita-se mecanicamente durante 10', leva-se a banho-maria a 56° durante ½ hora e centrifúga-se novamente. O precipitado separa-se, em geral, como um disco na superfície do líquido. Pipeta-se cuidadosamente e adicionam-se a 0.1 cc. do líquido claro, 0.9 cc. de água distilada, afim de reconstituir a isotonia. Caso alguns grumos do pre-

cipitado tenham sido acarretados, centrifúga-se novamente. Os *eluatos* assim obtidos, bem como os últimos líquidos de lavagem são submetidos á reação de Wassermann (técnica Eagle) e á reação de floculação de Eagle (tabela I).

TABELA I

Reações obtidas com os eluatos e os correspondentes líquidos de lavagem

1) Floculação

| I) Eluatos : | 0.3 cc. | II) Líquidos de lavagem | 0.3 cc. |
|---|---|---|---|
| (a) | +++ | (a) | — |
| (b) | +++ | (b) | — |
| (c) | +++ | (c) | — |

2) Fixação do complemento

| | 0.2 cc. | 0.1 cc. | | 0.2 cc. | 0.1 cc. |
|---|---|---|---|---|---|
| (a) | 0 | 4 | (a) | 4 | 4 |
| (b) | 1 | 4 | (b) | 4 | 4 |
| (c) | 0 | 3 | (c) | 4 | 4 |

0=Hemólise nula 4=Hemólise total 1,2,3 Graus intermediários de hemólise

Para verificar si, efetivamente, nas condições de técnica precedentes, a eluição da reagina era condicionada pela solução concentrada de NaCl a 10%, foram feitas experiências comparativas com NaCl a 0,85%.

Os resultados obtidos com tres diferentes sôros sifilíticos foram os seguintes (reação de floculação de Eagle):

TABELA II

| | Eluato em 0.85% NaCl | | | Eluato em 10% NaCl | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.4 | 0.2 | 0.1 |
| Sôro 1 | — | — | — | +++ | +++ | ± |
| Sôro 2 | — | — | — | +++ | +++ | — |
| Sôro 3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

Vê-se na tabela II que, com exceção do sôro 3, particularmente rico em reagina, e do qual foi possível a eluição mesmo em NaCl a

0,85%, os dois outros sôros só deram resultado positivo quando eluidos em NaCl a 10%.

Os resultados que acabam de ser apresentados apresentam um duplo interesse:

1.º) Porque simplificam a técnica da chamada reação de confirmação ("Bestätigungsreaktion") para o diagnóstico sôrologico da sífilis, seg. WITEBSKY (5), na qual um dos tempos mais delicados, fator frequente de insucesso, é a centrifugação a quente (56º), visto como o abaixamento da temperatura condiciona uma rápida reversibilidade da dissociação do complexo A. A.. Usando a técnica por nós indicada (eluição em 10% NaCl), a centrifugação a quente é dispensável e resultados nítidos se obtêm com absoluta regularidade.

2.º) A verificação de que o complexo lipoide-reagina sifilítica tem um comportamento perfeitamente semelhante ao do complexo anticorpo pneumocócico-polisacarídeo específico, em relação ao efeito das altas concentrações de NaCl, tornando possível a purificação do anticorpo sifilítico pela mesma técnica usada por HEIDELBERGER et al. para a purificação do anticorpo pneumocócico, reforça a idéa de que a reação de Wassermann é devida a uma reação antígeno-anticorpo lipoide, com as mesmas características das reações de precipitação específica.

## UEBER DIE SPALTUNG DES LUES ANTIGEN-ANTIKOERPERKOMPLEXES IN KONZENTRIERTER NaCl-LOESUNG

### *Zusammenfassung*

*In 10%iger NaCl-Loesung findet eine Spaltung des Lues Antigen-Antikoerperkomplexes statt, wodurch eine Reinigung des Reagins erzielt werden kann.*

*Die angegebene Technik stellt eine wesentliche Vereinfachung der Witebskyschen Bestaetigungsreaktion zur Serodiagnose der Syphilis dar.*

*Die Annahme, dass es sich bei der WaR um eine echte Antigen-Antikoerperreaktion handelt, wird hierdurch bestaetigt.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — BIER, O. G. — 1931 — *Compt. rend. Soc. Biol.*, **108**, 511.
2 — EAGLE, H. — 1935 — *Journ. Immunol.* 29, 467.
3 — HEIDELBERGER, M., KENDALL, F. E. e TEOREL, T. — 1936 — *Journ. Exp. Med.* **63**, 819.
4 — HEIDELBERGER, M., KENDALL, F. E. — 1936 — *Journ. Exp. Med.*, **64**, 161.
5 — WITEBSKY, E. — 1933 — *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. Exp. Ther.*, **80**, 323.

———o

# NOVAS ESPECIES DE "ELSINOË" E "SPHACELOMA" SOBRE HOSPEDES DE IMPORTANCIA ECONOMICA

POR

A. A. Bitancourt e Anna E. Jenkins

Do Instituto Biologico de S. Paulo e do Bureau of Plant Industry, Dept. of Agriculture, Washington, D. C.

Com as estampas 11-25

Em dois trabalhos anteriores (1) os autores apresentaram listas de hospedes de especies ainda não descritas de fungos dos generos *Elsinoë* e *Sphaceloma.* O presente trabalho traz a descrição de 7 dessas especies, sobre hospedes de maior ou menor importancia economica, ou seja o amendoim (*Arachis hypogea* L.) a *Zornia diphylla* L., planta forrageira, o charão (*Rhus vernix* L.), a pitombeira (*Talisia esculenta* RODLK.), a pitangueira (*Eugenia pitanga* KJ.), a "carne de vaca", madeira de lei (*Clethra brasiliensis* CHAM.) e o jasmim (*Jasminum Sambac* SOLAND).

Juntamente com essas especies foi estudado e incluido nas series paralelas de culturas representadas nas estampas 22 a 25 um fungo encontrado sobre uma fruta de cajá doce (*Spondias dulcis* FORST.) que, pelos seus caracteres culturais principalmente, aproxima-se dos representantes deste grupo de fungos. Por esse motivo tinha sido ele incluido na lista de novos hospedes contida nos trabalhos anteriores. Ante a escassez do material de estudo disponivel, entretanto, os autores preferem deixar para outra oportunidade a descrição desta nova especie, até que a obtenção de material mais abundante permita uma identificação mais exata do fungo.

## *Sphaceloma arachidis* n. sp.

Estampas 11, 12 e 13

Manchas pequenas, redondas ou irregulares, visiveis nas duas faces das folhas, com centro deprimido e margens levemente salientes, espalhadas ou frequentemente distribuidas nos dois lados ou justo acima da nervura principal, ás vezes confluentes. Na face superior das folhas, as manchas são de côr parda clara (*tilleul buff* (2)) até

(1) JENKINS, A. E. e A. A. BITANCOURT — Doenças causadas por fungos dos generos Elsinoë e Sphaceloma. *Rodriguésia* 2 (num. esp.) 305-313. 1936 (1937).

BITANCOURT, A. A. and A. E. JENKINS — New species, hosts, and distribution records of Elsinoë and Sphaceloma. *Chronica Botanica* 4:388-389. 1938.

(2) As cores são indicadas aproximadamente em português. A indicação precisa em inglês, é baseada em: Ridgway, R. Color standards and color nomenclature, 43 pp. 1912.

branca, com linha marginal estreita de côr marron *(Natal brown)* e frequentemente cobertas com um revestimento continuo, aveludado, de conidioforos e esporos de côr cinzenta olivacea, do fungo agente da doença, os quais mais tarde cáem, descobrindo os acérvulos pardos escuros até pretos; na face inferior, as manchas são de côr de canela (*pinkish cinnamon*) até pardo claro (*clay color*) ás vezes com uma margem de côr marron *(sayal brown)*. Nos peciolos e nas hastes, as manchas são mais numerosas e maiores, de forma oval, salientes, medindo até 3 mm. de comprimento, ás vezes coalescendo em areas mais ou menos extensas, causando distorções dos referidos orgãos. Acérvulos anfígenos, geralmente (ou na primeira fase) efusos, com base estromatica amarela, pouco desenvolvida, suportando pequenos grupos conicos de conidióforos densamente agregados, em forma de pêra, amarelos, com 8 a 12 μ de comprimento por 3 a 5 μ de espessura na base, ás vezes (ou na fase final) pulvinados, 50—250×45 μ, erumpentes, com uma bem desenvolvida base pseudoparenquimatica de côr amarela e camada externa ou paliçada de conidióforos globosos ou piriformes de coloração mais escura; conidias amarelas, alongadas, cilíndricas, levemente afinadas nas duas extremidades, continuas ou munidas de um septo, 12—20×3-4 μ, numerosas microconidias globosas de 1 μ de diametro aproximadamente, distribuidas por toda a superficie dos acérvulos.

Sobre meio de cultura de batata dextrose agar (3), o fungo tem um desenvolvimento lento, formando um talo compacto com superficie puberulenta, convoluta, de côr parda vinacea (*light vinaceous fawn)* com areas mais escuras, ás vezes pretas, e zona marginal humida.

*Maculis parvis, rotundis vel irregularibus, centro depressis et margine elevatis, conspersis, interdum confluentibus, superne pallidis vel albis, brunneo-marginatis, saepe primum e conidiophoris conidiisque velutinis, inferne roseo-cinnamomeis vel argillaceis, in petiolis et caulibus usque 3 mm. longis, interdum in areas latas coalescentibus; acervulis amphigenis, plerumque effusis, interdum pulvinatis, erumpentibus, 50-250 × 45 μ; conidiophoris in caespitibus conicis dense aggregatis vel paliformibus, globosis vel pyriformibus, flavis, 8-12 μ longis, basi 3-5 μ crassis; sporis flavis, elongato-cylindricis, utrinque attenuatulis, continuis vel uniseptatis, catenulatis, 12-20 × 3-4 μ; microconidiis numerosis, globosis, 1 μ diam.* (4).

Sobre folhas e hastes vivas de *Arachis hypogea* L. (Leguminosae) causando uma verrugose, no Estado de São Paulo, Brasil. Especimens depositados no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo: Itapecerica, E. de São Paulo, 17 de Janeiro

(3) A descrição dos fungos em cultura, nesta diagnose e nas seguintes, é baseada em culturas em tubo de ensaio, com 45 dias, em meio de batata-dextrose-agar (meio $B_1$ vêr a nota 5) mantidas á temperatura do laboratorio, em São Paulo, isto é, entre 18-28.°C. ou em media 24.°.

(4) Esta diagnose latina e as seguintes foram gentilmente preparadas por miss Edith Cash.

de 1937, H. S. FAWCETT (Tipo, 2371, tambem depositado nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos, sob o numero 73743); Itapecerica E. de S. Paulo, 31 de Janeiro de 1937, H. S. FAWCETT (2391); Cantareira, Est. de S. Paulo, 27 de Fevereiro, de 1938. A. A. BITANCOURT (de inoculações experimentais) (2892); Cantareira, Est. de São Paulo, 4 de Abril de 1938. A. A. BITANCOURT (2909).

### *Sphaceloma zorniae* n. sp.

Estampa 14

Manchas de tamanho muito variavel, em geral pequenas, mas podendo ocasionalmente alcançar 2 milimetros de diametro, muito irregulares, visiveis nas duas faces das folhas, deprimidas e frequentemente perfuradas no centro, ligeiramente salientes na periferia, frequentemente coalescentes, de côr marron clara *(sayal brown)* com o centro mais claro nas manchas grandes. Nas hastes as manchas são grandes, alongadas, acentuadamente salientes, com tecidos superficiais enrugados, rasgados, medindo até 4 mm. de comprimento, côr de canela rosea *(pinkish cinnamon)* frequentemente coalescendo em extensas areas rugosas, corticosas, envolvendo mais da metade da circunferencia das hastes; acérvulos coalescendo em um estroma continuo, com 40-100 μ de espessura, na superficie das lesões, internamente hialino, prosenquimático, na parte externa pseudoparenquimático e amarelado, até marron claro; camada externa do pseudoparenquima ou paliçada de conidióforos extremamente irregulares, densamente agregados, com 5-12 × 3-6 μ, alguns piriformes, com apice agudo, mais ou menos salientes, acima da superficie geral do estroma; não foram vistas conidias; abundantes microconidias oblongas, com 1×0,5 μ, dentro das celulas do hospede, do estroma e na superficie dos acérvulos.

*Maculis irregularibus, plerumque parvis, interdum usque 2 mm. diam., centro depressis et saepe perforatis, margine elevatulo, brunneis, in caulibus magnis, elongatis, conspicue elevatis, usque 4 mm. longis, saepe in areas latas rugosas suberosas roseo-cinnamomeas confluentibus; acervulis in stroma continuum, 40-100 μ crassum, coalescentibus; conidiophoris dense compactis, irregularibus, 5-12 × 3-6 μ; sporis non visis; microconidiis numerosis, oblongis, 1 × 0,5 μ.*

Sobre folhas e hastes vivas de *Zornia diphylla* L. (Leguminosae), causando uma verrugose, no Estado de Minas Gerais, Brasil. Especimen tipo depositado no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo: Viçosa, E. de Minas Gerais, 28 de Novembro de 1936. A. S. MÜLLER (2486) e nas coleções micologicas

do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos (73035).

### *Sphaceloma rhois* n. sp.

Estampa 15

Manchas numerosas, redondas ou irregulares, visiveis nas duas faces das folhas quando localisadas no limbo, e hipófilas quando nas nervuras, espalhadas, com 0,5 a 3 mm. de diametro ou mais frequentemente coalescentes, muitas vezes distribuidas ao longo das nervuras que as limitam nitidamente de um lado, com superficie superior de côr preta *(anilin black to black)* deprimidas nas lesões novas, salientes nas lesões velhas, ou na superficie inferior que tem a côr parda *(fawn color)*, causando um ligeiro engruvinhamento ou uma distorsão das folhas novas, que desaparece pouco a pouco com o desenvolvimento desses orgãos; nos peciolos as manchas são ovais, salientes, frequentemente coalescentes, com centro pálido e margens vermelho-escuras; acérvulos coalescentes em uma camada continua pseudoparenquimatica, que nos acervulos da face superior das lesões (ou em atmosfera seca?) têm coloração marron escura e é feita de celulas de paredes espessas, com conidióforos que não se podem distinguir da camada externa de celulas, que tem 10 - 40 μ de espessura; nos acérvulos da face inferior das lesões (ou em atmosfera húmida?) a camada pseudoparenquimática é fracamente desenvolvida, de côr amarelo-clara, e suporta conidióforos curtos, conicos ou curtamente cilindricos, geralmente sinuosos, com 6-15 × 3-5 μ; conidias amarelo-claras, ovoides ou cilíndricas, continuas ou munidas de um septo, ás veses em cadeias de duas a tres e possivelmente mais, com cicatriz de inserção na base, arredondadas ou com cicatriz no ápice, 8-16 × 3-6 μ. Muito semelhante a *S. arachidis*.

Sobre meio de cultura de batata dextrose agar, o fungo forma um talo compacto, de crescimento lento, com superficie húmida, quasi viscosa, convóluta, de côr marron escura *(mikado brown)* e conferindo ao meio uma côr amarela caracteristica.

*Maculis numerosis, rotundis irregularibusve, conspersis, 0,5-3 mm. diam. vel confluentibus, saepe nervisequentibus, superne nigris, inferne hinnuleis; acervulis in stratum continuum pseudo-parenchymaticum coalescentibus, superne nigro-brunneis, e cellulis crasse tunicatis compositis, 10-40* μ *crassis, inferne pallide-flavis, conidiophora gerentibus; conidiophoris breve conicis vel irregularibus, plerumque sinuosis, pallide flavidulis, 6-15* × *3-5* μ*; conidiis pallide flavidulis, ovoideis cylindricisve, continuis vel uniseptatis, catenulatis, cicatrice insertionis basilari vel apicali 8-16* × *3-6* μ.

Sobre folhas e galhos vivos de *Rhus vernix* L. (Anacardiaceae) causando uma antracnose, no Estado de São Paulo, Brasil. Especimen tipo depositado no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de S. Paulo: Cantareira, E. de São Paulo, 1 de Dezembro de 1937. E. Ract (2802) tambem depositado nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos (73024).

### *Elsinoë talisiae* n. sp.

Estampas 16 e 17

Manchas pequenas, irregulares, visiveis nas duas faces das folhas, secas e frequentemente rompidas, espalhadas, com 0,5 a 4 mm. de diametro, ou então densamente distribuidas dos dois lados das nervuras, e coalescentes, com o centro reduzido a uma membrana seca, pergaminhosa, translucida, de côr cinzento-clara, com uma linha marginal bem definida, estreita, de côr parda *(fawn color)*, constituida pelas nervuras mais finas das folhas; na face superior distinguem-se as frutificações pretas, lineares, da forma perfeita do fungo; na face inferior das lesões novas a penugem aveludada, de côr pardo-clara, da forma imperfeita; as manchas provocam dilaceramento e distenção dos tecidos foliares; nos peciolos as manchas são pequenas, sinuosas, alongadas, ligeiramente salientes, coalescentes, com superficie aspera, enrugada, com centro de côr cinzento-clara, frequentemente cobertas com as frutificações escuras do fungo, e com uma linha marginal estreita, de côr marron; ascomas quasi sempre epifilos, ás vezes desenvolvidos por baixo dos conidióforos da forma imperfeita, lineares quando situados por cima das nervuras mais finas das folhas, de que seguem as sinuosidades e ramificações, medindo até 2 mm. de comprimento, 100 a 200 μ de largura e 30-70 μ de espessura; ou então redondos, quando situados sobre a nervura principal ou ao seu lado, na face inferior da folha, alcançando até 250 μ de diametro, intraepidermicos, erumpentes, com interior pseudoparenquimático, hialino, e epitecio marron; ascos numerosos, imersos no pseudoparenquima, globosos ou ovoides, com paredes espessas no apice, 15-23 × 14-15 μ; ascosporos hialinos, munidos de 3 septos, ás vezes com um septo longitudinal em uma ou em ambas as celulas medianas, bem constritos no septo central, com a parte superior mais larga e curta que a inferior, rétos ou ligeiramente curvos, 11-17 × 4-7 μ. Forma imperfeita *(Sphaceloma)*: acérvulos ou feixes de conidióforos arredondados nas lesões do limbo, com diametro de 20 a 50 μ, alongados nas lesões da nervura principal, tendo em media de 20 × 100 μ, geralmente coalescendo em

uma camada continua de conidióforos que se assentam num pseudoparenquima amarelado, de 20 μ de espessura aproximadamente, erectos, retos ou ligeiramente flexuosos, piriformes ou progressivamente atenuados no apice quando curtos, irregularmente cilindricos quando mais compridos, com varias cicatrizes de inserção conidiana a diferentes alturas, e ocasionalmente geniculados em algumas dessas inserções, geralmente continuos, ás vezes munidos de um septo, levemente amarelados, mais escuros na base, muito raramente ramificados, 8-50 × 3-6 μ, suportando numerosas conidias muitas vezes reunidas em feixes; conidias de cor amarelo-clara, ovais, ou mais frequentemente cilindricas e frequentemente um tanto constrictas na região mediana, quasi sempre continuas, ocasionalmente munidas de um septo, atenuadas e com uma cicatriz de inserção bem definida na base, arredondadas e ás vezes com uma ou mais cicatrizes de inserção, ás vezes geniculadas, no apice, e em cadeias de 2 a 4 e possivelmente mais, 8-20 × 3-6 μ. Muito semelhante á forma imperfeita de *Elsinoë fawcetti.*

Em meio de cultura de batata dextrose agar, o fungo produz um talo de crescimento lento, compacto, quasi pulvinado, umbonado, com superficie a principio pubescente, deliquescendo em seguida, de cor marron *(sorghum brown)* e margem mais clara, escondida pela penugem branco-suja.

*Maculis parvis, irregularibus, exaridis et frequenter laceratis, conspersis, 0,5-4 mm. diam. vel densis et confluentibus, centro translucente, pallide griseolo, nervulis limitatis; ascomatibus plerumque epiphyllis, linearibus, nervisequentibus et saepe sinuosis ramosisque, usque 2 mm. longis, 100-200 μ latis et 30-70 μ crassis, intraepidermicalibus, erumpentibus; ascis numerosis, globosis ovoideisve, apice incrassatis, 15-23 × 14-15 μ; ascosporis hyalinis, 3-septatis, interdum cellulis centralibus longitudinaliter septatis, medio constrictis, parte superiore latiore et breviore, rectis vel curvulis, 11-17 × 4-7 μ; acervulis rotundis, 20-50 μ diam. vel elongatis, 20 × 100 μ, in stratum continuum coalescentibus; conidiophoris rectis vel leniter flexuosis, pyriformibus, brevibus et apice attenuatulis, vel longioribus et irregulariter cylindraceis, continuis vel uniseptatis, dilute flavidulis, raro ramosis, 8-50 × 3-6 μ; conidiis numerosis, pallide flavis, ovalibus vel plerumque cylindraceis et medio constrictis, continuis vel interdum uniseptatis, attenuatis, cicatricibus insertionis basilaribus et interdum apicalibus, catenulatis, 8-20 × 3-6 μ.*

Sobre folhas vivas de *Talisia esculenta* RODLK. (Sapindaceae) causando uma antracnose nos Estados de São Paulo e da Paraíba. Especimens depositados no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de S. Paulo: Alagoinha, E. da Paraíba, 24 de Setembro de 1937, J. DESLANDES (Tipo, 2787, tambem depositado nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos sob o numero 73023); Alagoinha, E. da Paraíba, Janeiro de 1938, J. DESLANDES (2870); Barretos, E. de S. Paulo, Outubro de 1939, BEZERRA FILHO (3373).

## *Elsinoë pitangae* n. sp.

Estampa 18

Manchas pequenas, arredondadas, visiveis nas duas faces das folhas, deprimidas e ocasionalmente perfuradas no centro, com beiras salientes, espalhadas, e com 0,2 a 2 mm. de diametro, ou ás vezes coalescentes, com centro seco, pardo-aroseado-claro *(pinkish buff)* na face inferior, escurecido pelas frutificações do fungo na face superior, com margens de côr vermelho-aroxeado-escura *(neutral red to Mars violet)* que se dilue insensivelmente, na periferia, na côr verde normal da folha; manchas maiores com centro plano, acinzentado em consequencia do dessecamento e esvasiamento das celulas epidermicas que se acham mais ou menos rompidas pelas frutificações escuras do fungo; as manchas podem causar uma distorsão da folha nova, onde ocupam o centro de uma ligeira depressão cónica da face inferior, a qual desaparece á medida que se desenvolve a folha; nos galhos, manchas pequenas, inconspicuas, mal definidas, mais ou menos salientes, avermelhadas, produzindo uma aspereza da casca dos galhos mais velhos; ascomas intraepidermicos, pulvinados, 90-150 × 45-70 μ, erumpentes, com centro pseudoparenquimatico hialino ou amarelo claro, e epitecio pardo escuro; ascos espalhados irregularmente e imersos no pseudoparenquima, globosos ou ovoides, com parede mais espessa no apice, 18-21 × 14-18 μ; ascosporos hialinos com 2 a 4 celulas, ligeiramente constritos nos septos, retos ou ligeiramente curvos, 14-20 × 4-6 μ.

Em meio de cultura de batata dextrose agar, o fungo desenvolve-se lentamente em um talo compacto com superficie puberulenta, convoluto, preto avermelhado *(dull purplish black)* até preto, com curta penugem de côr branca suja.

*Maculis parvis, rotundis, depressis et interdum perforatis, conspersis, 0,2-2 mm. diam. vel confluentibus, centro arido, inferne roseo-pallidis, superne obscurioribus, rubro vel violaceo marginatis; ascomatibus intraepidermicalibus, pulvinatis, 90-150 × 45-70 μ, erumpentibus, intus flavidulis, pseudoparenchymatibus, epithecio nigro-brunneo; ascis irregulariter conspersis, globosis ovoideisve, apice incrassatis, 18-21 × 14-18 μ; ascosporis hyalinis, 2-4 cellularibus, ad septa leniter constrictis, rectis vel curvulis, 14-20 × 4-6 μ.*

Sobre folhas e galhos de *Eugenia pitanga* Kj. (Myrtaceae), causando uma antracnose, nos Estados de São Paulo, Baía, Rio de Janeiro e Distrito Federal. Especimens depositados no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo: Cantareira, E. de São Paulo, Brasil, 3 de Dezembro de 1934, E. Ract (1794); Cantareira, E. de S. Paulo, Brasil, 12 de Março de 1937, H. S. Fawcett (2482); Salvador, E. da Baía, Brasil, 17 de Março

de 1937, FAWCETT & BITANCOURT (2497); Cantareira, E. de S. Paulo, Brasil, 20 de Dezembro de 1937 e 4 de Janeiro de 1938, A. A. BITANCOURT (2816, tipo, tambem depositado nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos sob o numero 73018); Cantareira, E. de São Paulo, Brasil, 15 de Março de 1938, A. A. BITANCOURT (2901); Jardim Botanico, Rio de Janeiro, Brasil, 12 de Outubro de 1938, A. A. BITANCOURT (3023); Cabo Frio, Est. do Rio de Janeiro, Brasil, 16 de Outubro de 1938, A. A. BITANCOURT (3029).

E' aparentemente a mesma doença que se encontra nos seguintes especimens de uma planta silvestre (? *Stenocalyx sulcatus* BERG.): Viamão, Est. do Rio Grande do Sul, Brasil, 8 de Abril de 1937, FAWCETT & BITANCOURT (2570); Sant'Ana, Misiones, Argentina, 23 de Abril de 1937, FAWCETT & BITANCOURT (2554).

### *Elsinoë clethrae* n. sp.

Estampas 19 e 20

Manchas redondas ou irregulares, epifilas nas folhas normais coriaceas, visiveis nas duas faces das folhas tenras, serradas, dos ladrões, espalhadas e com 0,5 a 4 mm. de diametro, ou coalescentes em areas mais ou menos extensas, secas; na face superior as manchas têm o centro branco-acinzentado em consequencia do dessecamento e esvasiamento das celulas epidermicas, coberto das frutificações de côr marron-escura até preta, do fungo causal; têm uma margem mais ou menos larga, de côr marron-avermelhada *(burnt lake)* ou mais escura, na periferia, onde a côr se dilue insensivelmente no verde normal da folha, e quasi preta do lado do centro da mancha; na nervura principal e no peciolo, as manchas são alongadas, pouco visiveis; ascomas redondos, pulvinados, desenvolvidos sob a cuticula ou dentro das celulas epidermicas, diretamente assentados sobre a camada de celulas em paliçada, da folha, cobertos com os restos da cuticula ou das paredes externas das celulas epidermicas, com 80-250 μ de diam. 30-80 μ de espessura, com centro pseudoparenquimatico amarelado e epitecio espesso pardo-escuro; ascos numerosos, aglomerados principalmente na parte superior do pseudoparenquima, globosos ou ovoides, com parede mais espessa no apice, 20-25 × 16-18 μ, contendo de 4 a 8 ascosporos; ascosporos hialinos, com 4 celulas, quasi sempre com septos longitudinais nas duas celulas centrais, constritos no septo central, retos ou ligeiramente curvos, com celulas superiores mais curtas e grossas que as celulas inferiores, 13-18 × 5-8 μ; forma imperfeita *(Sphaceloma)*: acérvulos ou esporodoquios espalhados, irregulares ou coalescendo em um estroma continuo, erumpente, com 30-50 μ

de espessura, feito de celulas isodiametricas, hialinas ou amarelo-palidas na parte interna, em contacto com a camada de celulas em paliçada da folha, escurecendo e alongando-se perpendicularmente á superficie da folha, na parte externa onde se acha uma camada de celulas alongadas ou paliçada de conidióforos densamente agregados, de côr pardo-escura; não foram vistas conidias.

Em meio de cultura de batata dextrose agar, o fungo se desenvolve em um talo de crescimento lento, compacto, com superficie convoluta, humida ou viscosa, de côr roxo-escura *(Mars violet).*

*Maculis rotundis vel irregularibus, plerumque epiphyllis, interdum amphigenis, conspersis, 0,5-4 mm. diam. vel in areas aridas latas coalescentibus; ascomatibus rotundis, pulvinatis, subcuticularibus, 80-250 μ diam., 30-80 μ crassis; ascis numerosis, globosis ovoideisve, apice incrassatis, 80-24 × 16-18 μ, 4-8-sporis; ascosporis hyalinis, 4-cellularibus, plerumque cellulis centralibus longitudinaliter septatis, medio constrictis, rectis vel curvulis, cellulis superioribus latioribus et brevioribus, 13-18 × 5-8 μ; acervulis conspersis, irregularibus vel in stroma continuum erumpentem 30-50 μ crassum coalescentibus; conidiis non visis.*

Sobre folhas de *Clethra brasiliensis* CHAM. (Ericaceae) causando uma antracnose, no Estado de São Paulo. Especimen depositado no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo: Serra dos Cristais, E. de S. Paulo, Brasil, 29 de Agosto e 27 de Setembro de 1937, R. D. GONÇALVES e J. F. AMARAL (2728), tipo, tambem depositado nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos sob o numero 73021.

## *Elsinoë jasminae* n. sp.

**Estampa 21**

Manchas sarnentas numerosas, redondas ou mais frequentemente irregulares, visiveis nas duas faces das folhas, espalhadas irregularmente entre as nervuras, medindo até 2 mm. de diametro, coalescendo em areas extensas, irregulares, um tanto rugosas; na face superior as manchas são ligeiramente salientes, com centro plano ou um tanto deprimido, de côr pardo-clara *(tilleul buff)* até branca, com larga margem marron *(army brown)*, na face inferior, salientes ou mais ou menos pulvinadas, ás vezes levemente deprimidas no centro, de côr pardo-aroseada *(pinkish buff to cartridge buff)*; nas hastes, manchas variaveis, irregulares, muito ligeiramente salientes, em regra coalescentes, de côr pardo-clara *(cartridge buff)* com margem larga de coloração marron *(Verona brown to warm sepia)*, medindo até 6 mm. de diametro; ascomas redondos, pulvinados, a principio cobertos com a cuticula da epiderme do hospede, com centro hialino pseudoparenquimatico, e epitecio escuro, 50-120 μ de diametro, e 25-50 μ de

espessura; ascos numerosos, aglomerados sob o epitecio, e enchendo quasi completamente a parte superior do pseudoparenquima de que apenas se distinguem poucos elementos cellulares no intervalo, globosos, com parede mais espessa no apice, 12-18 μ de diam., contendo de 2 a 8 ascosporos hialinos, com 4 celulas, ás vezes munidos de um septo longitudinal numa ou nas duas celulas medianas, com septo mediano constricto, retos ou ligeiramente curvos, com 10-14 × 4-6 μ; forma imperfeita conidiana *(Sphaceloma)* pouco desenvolvida, erumpente, pardo-escura, reduzida a pequena paliçada de conidióforos coalescentes sobre uma base reduzida de pseudoparenquima hialino, desenvolvido dentro da epiderme, erumpente, com 30 a 100 μ de diametro, 15-30 μ de espessura. Não foram vistas conidias.

Nas lesões se encontram numerosos picnidios desenvolvidos no interior da epiderme, e erumpentes, achatados, com paredes pseudoparenquimaticas de côr amarela na base, pardo-escura na parte superior, cobertos com os restos das paredes externas da epiderme partida, com 50-200 μ de diam. 20-80 μ de altura, cheios de picnosporos aglomerados por uma mucilagem, hialinos, cilindricos, com extremidades arredondadas, medindo 3-8 × 1,5-2,5 μ. Estes picnidios pertencem possivelmente ao ciclo evolutivo do fungo.

*Verrucis numerosis, rotundis vel irregularibus, conspersis, usque 2 mm. diam. vel in areas latas irregulares scabras confluentibus, superne elevatulis, centro depresso, albidis pallidisve, brunneo-marginatis, inferne elevatis, pulvinatis, roseo-flavidulis, in caulibus usque 6 mm. diam.; ascomatibus rotundis, pulvinatis, primo cuticula tectis, 50-120 μ diam., 25-50 μ crassis; ascis numerosis, dense congestis, globosis, apice incrassatis, 12-18 μ diam., 2-8-sporis; ascosporis 4-cellularibus, interdum cellulis centralibus longitudinaliter septatis, medio constrictis, rectis vel curvulis, 10-14 × 4-6 μ; palis conidiophororum parvis, erumpentibus, nigro-brunneis, 30-100 μ diam., 15-30 μ crassis; conidiis non visis.*

Sobre folhas e hastes de *Jasminum Sambac* SOLAND (Oleaceae) produzindo uma verrugose, no Estado de São Paulo. Especimens depositados no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de S. Paulo: S. Sebastião, E. de São Paulo, Brasil, 16 de Fevereiro de 1937, FAWCETT & BITANCOURT (2404) tipo, tambem depositado nas coleções micologicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., Estados Unidos, sob o numero 73744; S. Sebastião, Est. de S. Paulo, Brasil, Janeiro de 1938, G. VAN VEYERN (2863).

## COMPARAÇÕES CULTURAIS

Os diversos fungos descritos no presente trabalho, com exceção de *Sphaceloma zorniae,* foram isolados, recorrendo-se para *Elsinoë pitangae, E. clethrae* e *E. jasminae* ao isolamento a partir de um único

ascosporo, para *E. talisiae* e *S. rhois* a partir de uma conidia e para *S. arachidis* a cultura de tecido. Duas series paralelas de comparação foram feitas, sendo uma delas sobre batata-dextrose-agar (meio A [5]), caldo de carne-agar e farinha de milho-agar. As culturas em tubo, dessa serie, foram mantidas na temperatura do laboratorio e após um mês, aproximadamente, foram desenhadas a côres (estampa 22).

Numa segunda serie, uma cultura de cada um dos isolamentos e mais uma outra estirpe de *Elsinoë clethrae*, assim como uma cultura de *Elsinoë phaseoli* isolada de *Phaseolus lunatus* L. proveniente de Cuba, foram utilisadas. De cada uma das culturas foram preparados varios tubos e caixas de Petri, sendo parte em meio B e parte em meio C, ambos de batata-dextrose-agar, conservada a metade de cada parte á temperatura de 32° e metade á temperatura do laboratorio que durante todo o tempo da experiencia oscilou entre 18 e 28°, sendo em media de 24°. As estampas 23, 24 e 25, representam o desenvolvimento de tais culturas após 64 dias.

## NEW SPECIES OF "ELSINOË" AND "SPHACELOMA" ON HOSTS OF ECONOMIC IMPORTANCE

### Abstract

*Technical descriptions are given of seven new species of Elsinoë and Sphaceloma discovered in Brazil between 1934 and 1939. These fungi and their hosts, all plants of economic importance, are listed below: S. arachidis on Arachis hypogea*

---

(5) Os meios de batata-dextrose-agar empregados nessas series paralelas foram preparados por tres metodos diferentes. Estudos anteriores com fungos do mesmo grupo, mostraram que pequenas diferenças no modo de preparar o meio de batata-dextrose-agar, eram suficientes para determinar diferenças notaveis no aspéto das culturas. As fotografias das estampas 23, 24 e 25, demonstram o que acabamos de afirmar. Os 3 métodos para preparar o meio de batata-dextrose-agar são os seguintes:

Meio A:

| | |
|---|---|
| Tuberculos de batatinha | 250 gramas |
| Agar-Agar | 20 " |
| Dextrose | 20 " |
| Agua | 1 litro |

As batatas, descascadas e cortadas em pequenas fatias com uma faca inoxidavel, são pesadas na agua, que é fervida durante 40 minutos e em seguida filtrada em algodão. Acrescentam-se o agar e a dextrose e leva-se ao fogo até dissolver, filtrando-se em seguida e distribuindo-se no vasilhame onde o meio é esterilisado por 25 minutos á pressão de 1 atmosfera.

Meio B:

| | |
|---|---|
| Tuberculos de batatinha | 300 gramas |
| Agar-Agar | 30 " |
| Dextrose | 20 " |
| Agua | 1 litro |

O processo de preparação deste meio é identico ao anterior.

Meio C (modificação do meio anterior por E. Ract):

| | |
|---|---|
| Tuberculos de batatinha | 400 gramas |
| Agar-Agar | 25 " |
| Dextrose | 30 " |
| Agua | 1 litro |

A batata é preparada como para os meios anteriores e o agar é cuidadosamente lavado antes de ser acrescentado, sendo tudo levado ao fogo para dissolver. *A dextrose é acrescentada somente após* dissolução a quente, do agar. O resto das operações é identico ao dos dois meios anteriores.

*(Leguminosae), S. zorniae on Zornia diphylla (Leguminosae), S. rhois on Rhus vernix (Anacardiaceae), E. talisiae on Talisia esculenta (Sapindaceae), E. pitangae on Eugenia pitanga (Myrtaceae), E. clethrae on Clethra brasiliensis (Ericaceae), and E. jasminae on Jasminum sambac (Oleaceae).*

*Single ascospore cultures of E. pitangae, E. clethrae and E. jasminae were made, and single conidium cultures of E. talisae and S. rhois, while S. arachidis was isolated from a tissue culture. Another isolation reported was that of a species of Sphaceloma on Spondias dulcis, as yet undescribed.*

*These isolations were compared in parallel test tube cultures on potato dextrose, beef, and cornmeal agar media, where all presented a more or less similar type of growth for each medium represented, although this was distinct for each species as shown by the colored plate. Other cultural comparisons in test tubes and Petri dishes were made on potato-dextrose agar media of two different modifications as compared with that used in the first experiment. A culture of Elsinoë phaseoli was included for comparison with S. arachidis. In one of these tests the cultures were held at 32° C at which temperature they all produced growth, although in varying amounts for the different species.*

*Abundant infection on peanut (Arachis hypogea) resulted from inoculation with a culture of Sphaceloma arachidis.*

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 11

*Sphaceloma arachidis* sobre hastes e folhas de *Arachis hypogea* L. × 1.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

### Estampa 12

*Sphaceloma arachidis* sobre folhas de *Arachis hypogea* L. (inoculações experimentais) × 1. *a*, face superior da folha, todas as outras face inferior.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

### Estampa 13

*Sphaceloma arachidis* sobre *Arachis hypogea* L. *A*, secção transversal de uma lesão de folha, vendo-se as frutificações na face superior. *B* a *F*, Detalhes das frutificações, mostrando os conidioforos e as conidias. *G* e *H*, Microconidias na superficie das lesões. *I* e *J*, frutificações desenvolvidas em esporodoquio nas lesões velhas. *A*, × 100. *B* a *J*, × 500.

Fot. BITANCOURT

### Estampa 14

*Sphaceloma zorniae* sobre *Zornia diphylla* L. *A* e *B*, sobre folhas e hastes. *A* × *1*, *B* × *5*. *C*, acervulos formando um revestimento continuo sobre lesão da folha × 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 15

*Sphaceloma rhois* sobre *Rhus vernix* L. *A* e *B*, sobre folhas × 1; *C*, sobre galhos × 1; *D* e *E*, detalhes das lesões das folhas, × 5; *D*, face superior; *E*, face inferior. *F* a *K*, conidias e conidioforos na superficie das lesões, × 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 16

*Elsinoë talisiae* sobre *Talisia esculenta* RODLK., *A* a *D*, sobre folha, *A*, face superior, × 1; *B*, detalhe × 5; *D*, face inferior × 1; *C*, detalhe × 5; *E*, peciolo × 1.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 17

*Elsinoë talisiae* sobre *Talisia esculenta* RODLK. *A* e *B*, conidioforos na superficie das lesões; *C*, conidias; *D*, grupo de conidioforos coalescentes nas lesões novas e asco por baixo. *E* e *F*, ascomas × 500.

Fot. BITANCOURT

Estampa 18

*Elsinoë pitangae* sobre *Eugenia pitanga* BERG. *A* a *C*, sobre folhas. *A* × 1; *B*, detalhe da face superior, × 5; *C*, detalhe da face inferior × 5; *D* e *E*, ascomas × 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 19

*Elsinoë clethrae* sobre *Clethra brasiliensis* CHAM. *A* e *B*, sobre folha, *A* pagina superior, *B* pagina inferior. A folha menor é de um "ladrão"; a folha maior é normal, × 1; *C*, detalhe, vendo-se os ascomas *a*, × 5.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 20

*Elsinoë clethrae* sobre *Clethra brasiliensis* CHAM. *A* e *B*, esporodoquios da forma imperfeita. *C* e *D*, ascomas. *E*, *F*, *G*, fases sucessivas de desenvolvimento de um ascosporo, em meio de batata-dextrose agar. *E*, após 24 horas; *F*, após dois dias; *G*, após 3 dias. *A* a *D*, × 500. *E*, × 200. *F* e *G*, × 100.

Fot. BITANCOURT

Estampa 21

*Elsinoë jasminae* sobre *Jasminum Sambac* SOLAND. *A* a *C*, sobre folha, *A* a esquerda face superior, a direita face inferior, × 1; *B*, detalhe da face superior, vendo-se os ascomas × 5; *C*, detalhe da face inferior × 5. *D* e *F*, paliçada de conidioforos formando um acervulo erumpente × 500. *E*, picnidio presente nas lesões, × 500; *G* e *H*, ascomas × 500; *I*, ascos e ascosporos, × 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 22

Culturas transferidas em 22 de junho de 1938 mantidas á temperatura de laboratorio e desenhadas entre 14 de junho e 21 de julho de 1938. *A-G*, sobre batata dextrose agar (meio A, pH 6,8) *A*, *Sphaceloma arachidis*; *B*, fungo de *Spondias dulcis*; *C*, *Sphaceloma rhois*; *D*, *Elsinoë talisiae*; *E*, *Elsinoë pitangae*;

*F, Elsinoë clethrae; G, Elsinoë jasminae.* Nota: as culturas de *Elsinoë* são provenientes de um só ascosporo com excepção de *E. talisiae* que provem de uma conidia como a cultura de *S. rhois*. *H-N*, culturas correspondentes a *A-G*, na ordem vertical, sobre caldo de carne-agar. *O-U*, culturas correspondentes ás anteriores sobre farinha de milho-agar. Após a preparação dos desenhos, as culturas foram conservadas em refrigerador onde a cultura *B* torncu-se preta, levemente pardascenta, com penugem clara, a cultura *G* ficou côr de mogno *(mahogany red)* e a cultura *N*, côr de cebola *(onion skin pink)*. × 1.

Desenhado por J. MARION SHULL

Estampa 23

As mesmas culturas da estampa 22 e mais *Elsinoë phaseoli* com 64 dias sobre batata-dextrose-agar (meio B) mantidas na temperatura do laboratorio (em media de 20 a 25 graus C) *A, Sphaceloma arachidis; B, Elsinoë phaseoli; C,* fungo de *Spondias dulcis; D, Sphaceloma rhois; E, Elsinoë talisiae; F, Elsinoë pitangae; G, Elsinoë clethrae; H, Elsinoë jasminae.* × 1.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 24

Culturas de 64 dias sobre batata-dextrose agar (meio C) mantidas na temperatura do laboratorio (em media 20 a 25° C). *A, Sphaceloma arachidis; B, Elsinoë phaseoli; C, Sphaceloma rhois; D, Elsinoë talisiae; E, Elsinoë pitangae; F, Elsinoë clethrae; G, Elsinoë clethrae* (outra estirpe); *H, Elsinoë jasminae.* × 1.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 25

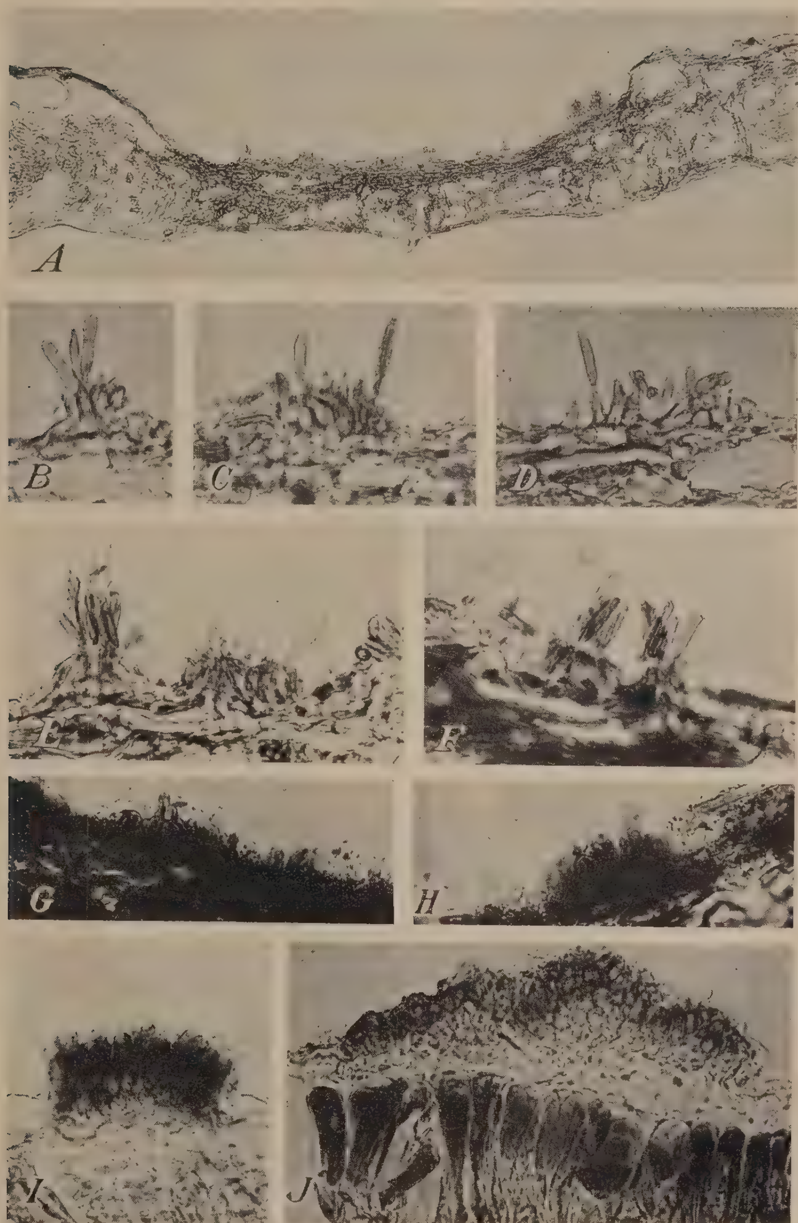
Culturas de 64 dias sobre meio B, a esquerda, e C á direita, mantidas a 32.° Cent.; *A* e *B, Sphaceloma arachidis, C* e *D,* fungo de *Spondias dulcis; E* e *F, Sphaceloma rhois; G* e *H, Elsinoë talisiae; I* e *J, Elsinoë clethrae; K* e *L, Elsinoë jasminae.* × 1.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

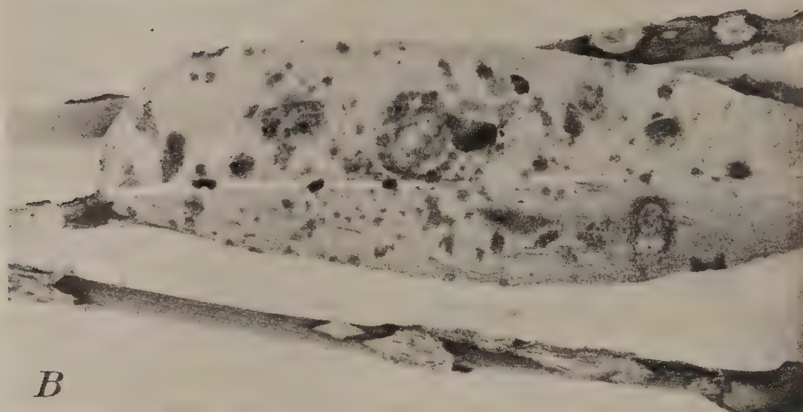
-o-

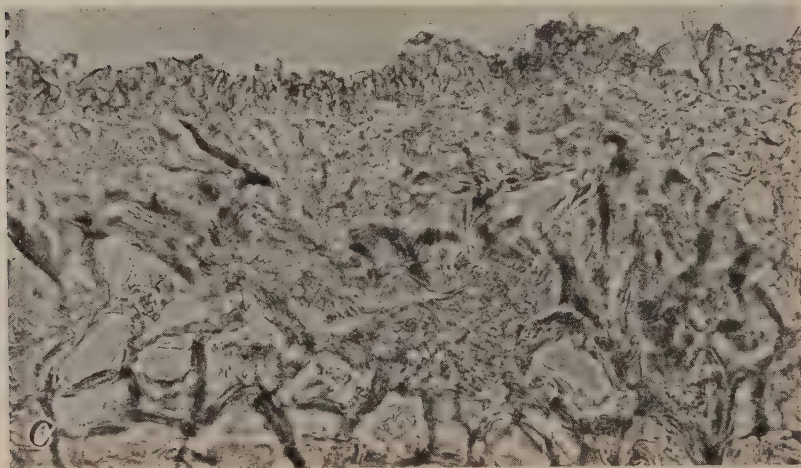


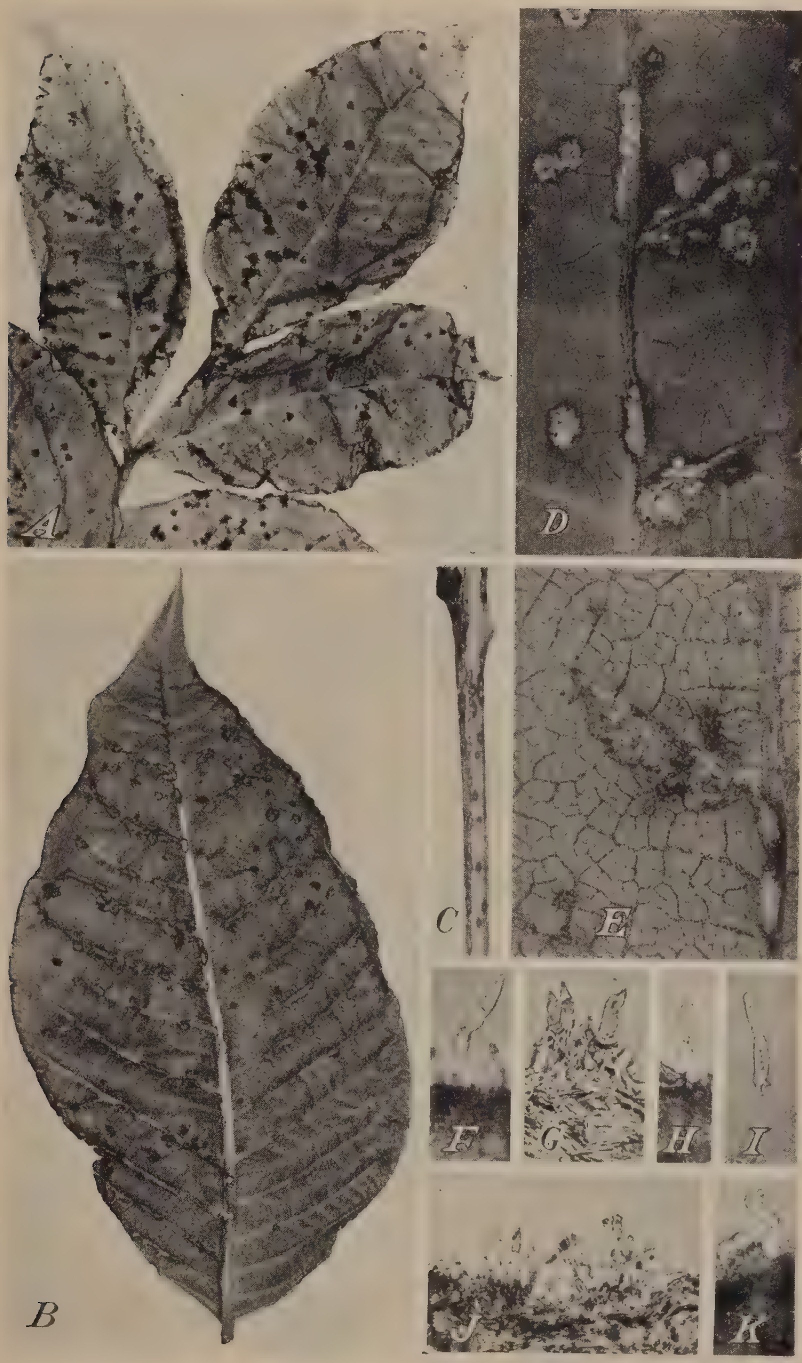

a

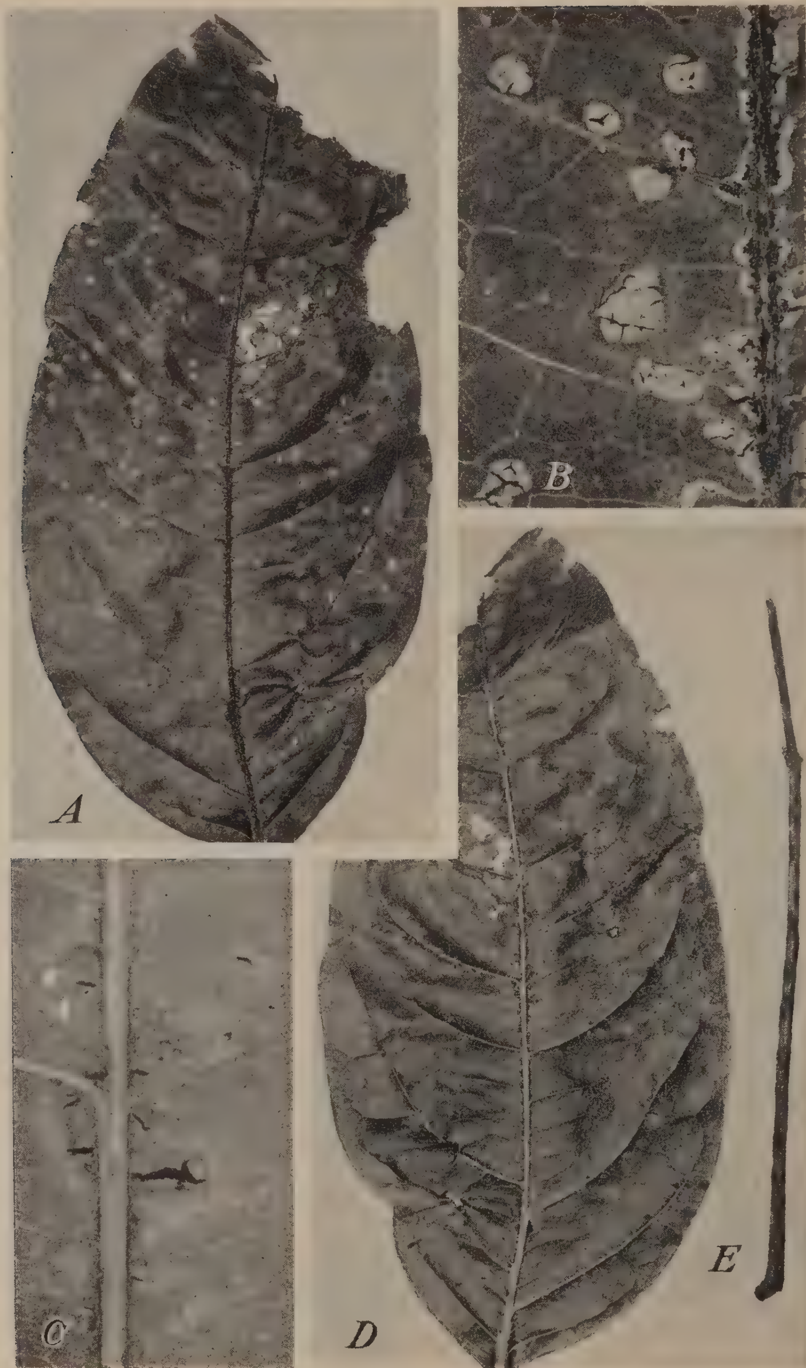

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

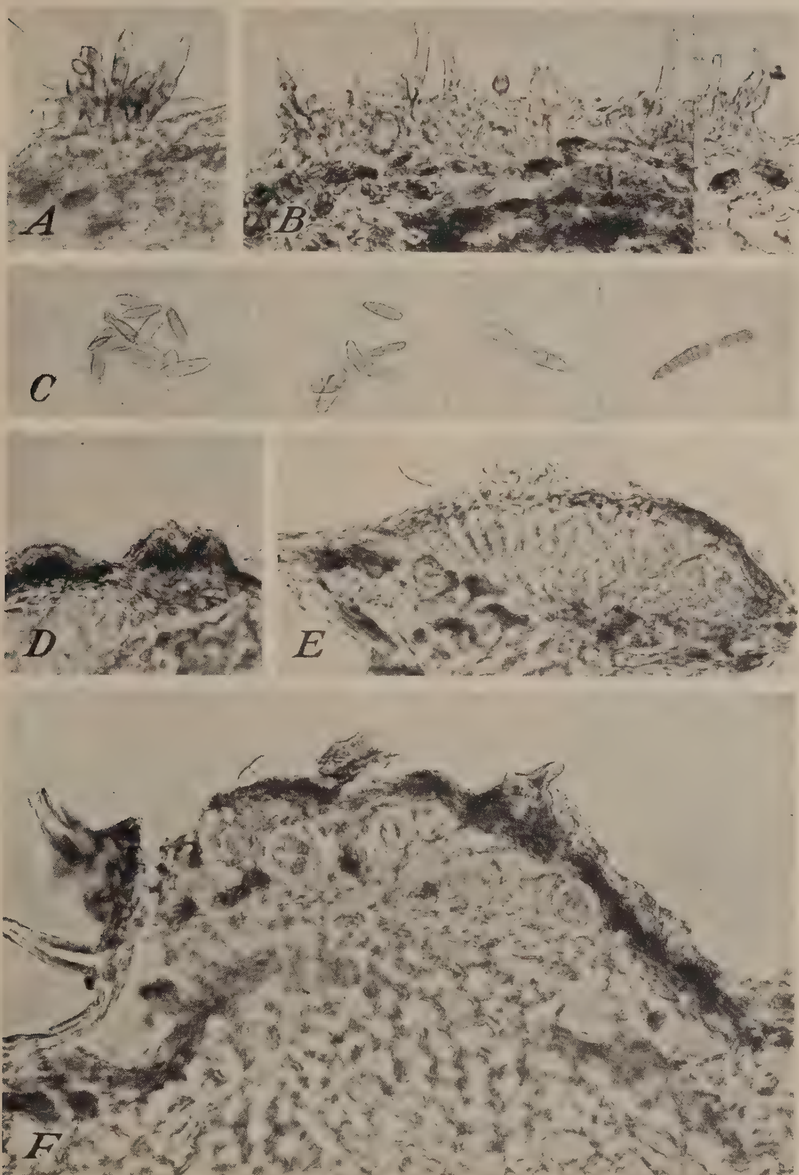

A


B

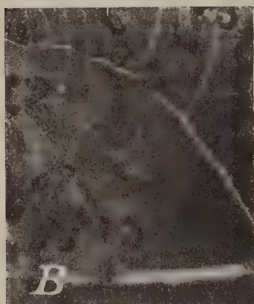

C

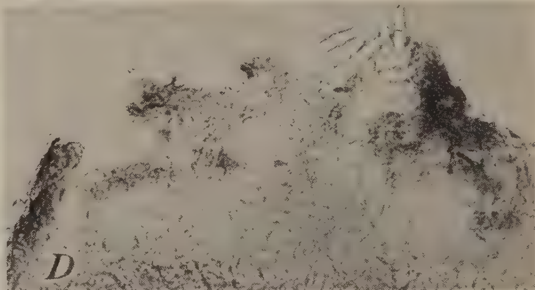

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K

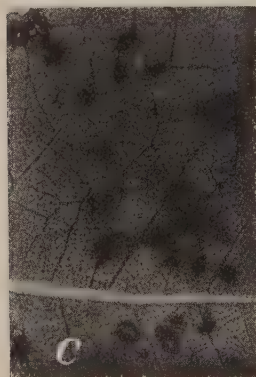

A
B
C
D
E


A
B
C
D
E
F


A

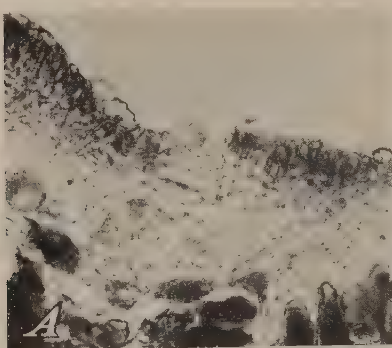

B

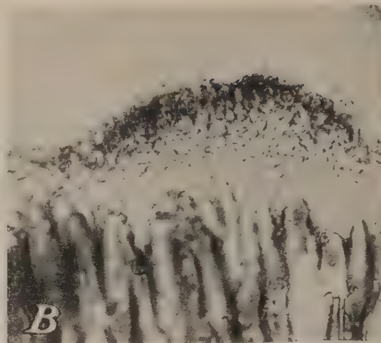

D

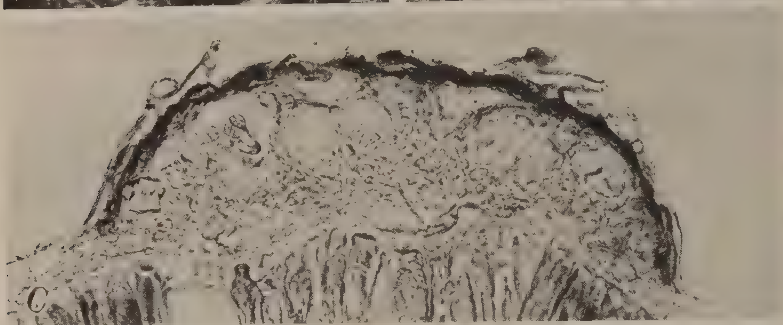

C

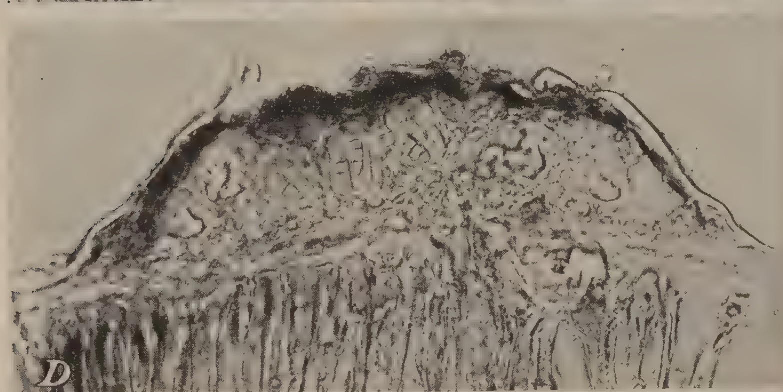

E


A
B
C
a

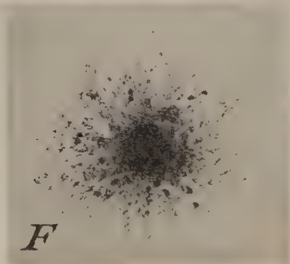

A

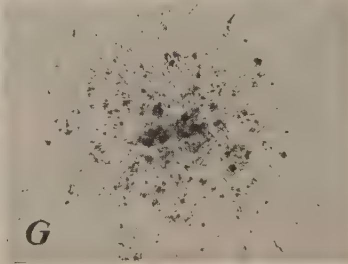

B

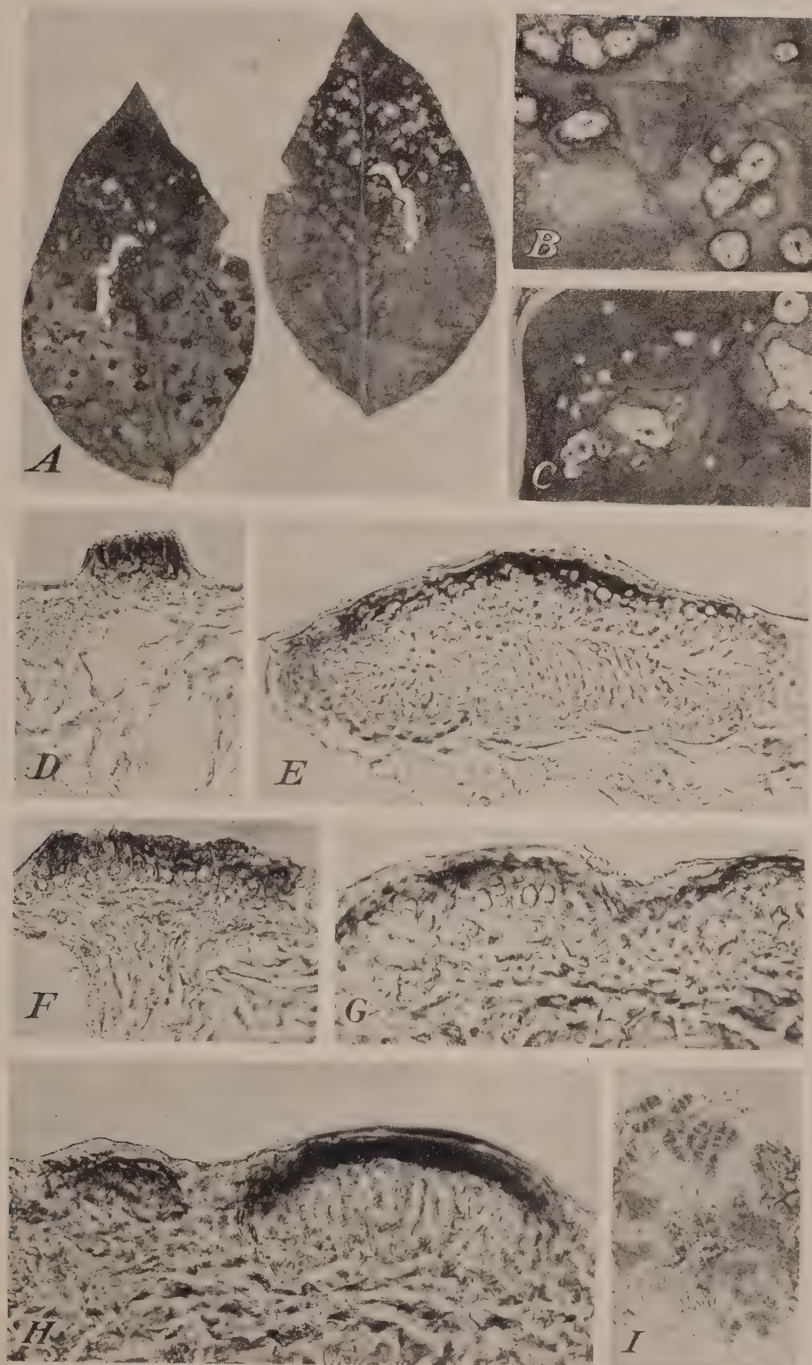

C


D

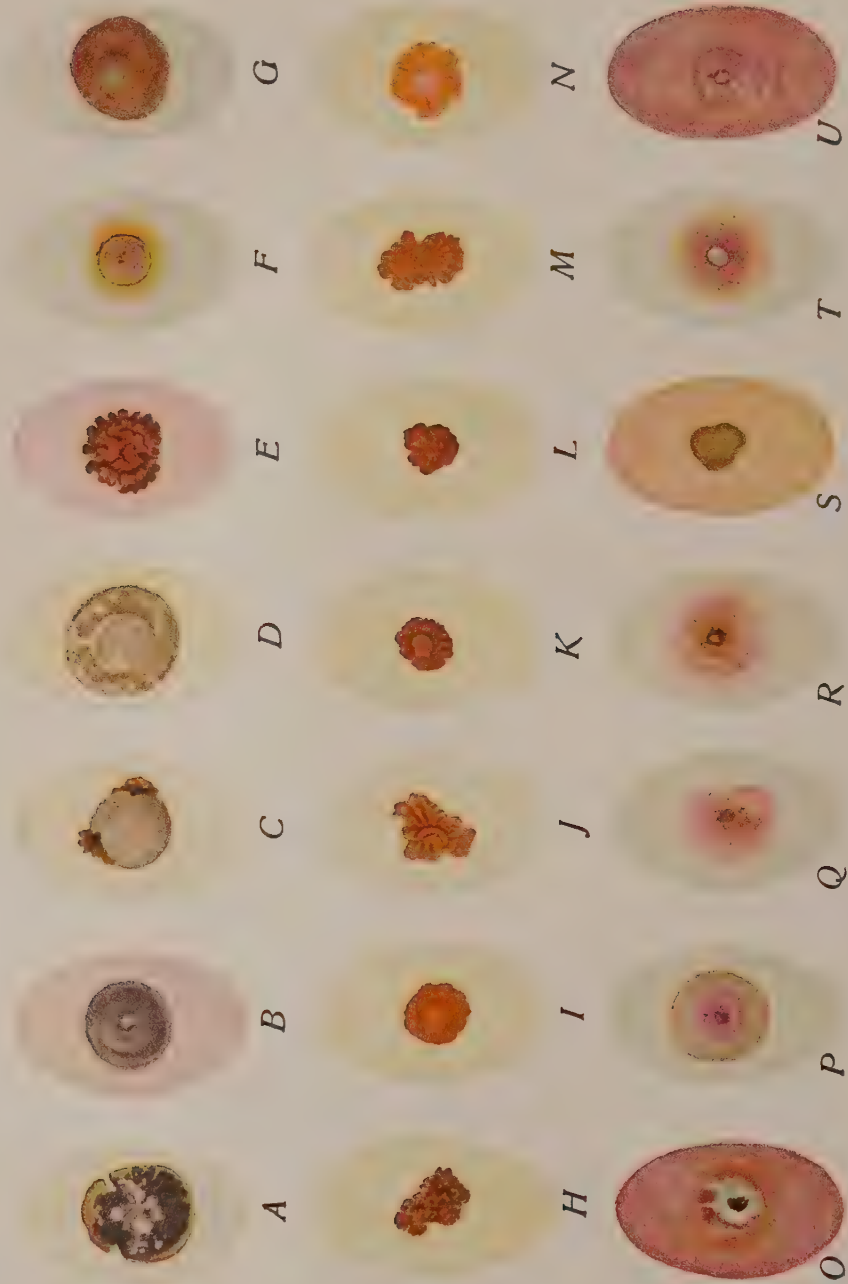

E

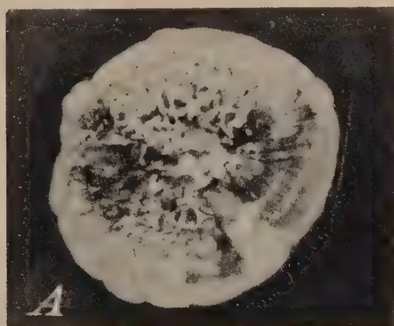

F

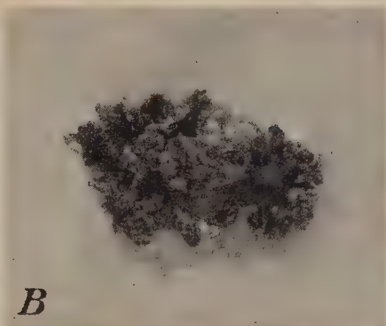

G

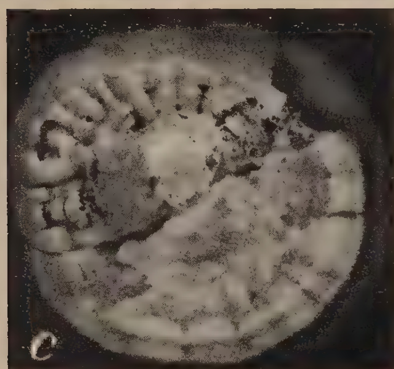

A
B
C
D
E
F
G
H
I

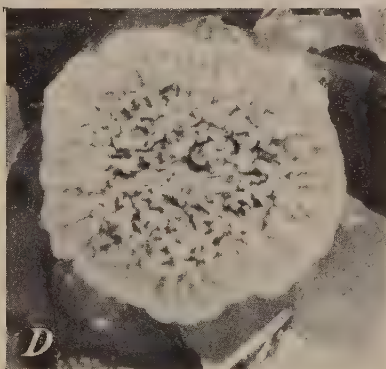
Arq. do Inst. Biologico, Vol. 11
Estampa 22

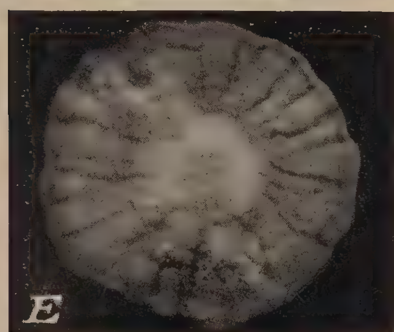


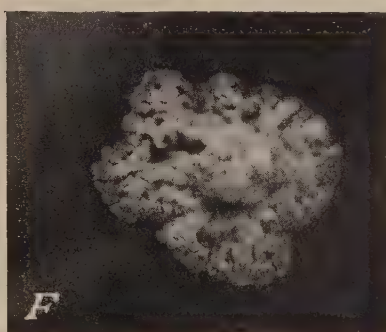

A

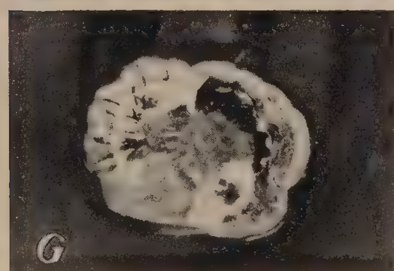

B


C

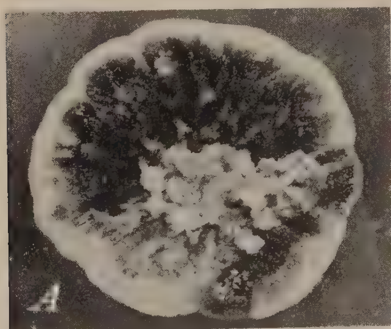

D

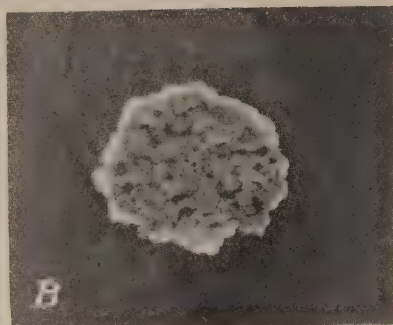

E

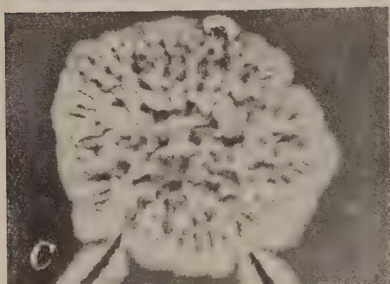

F

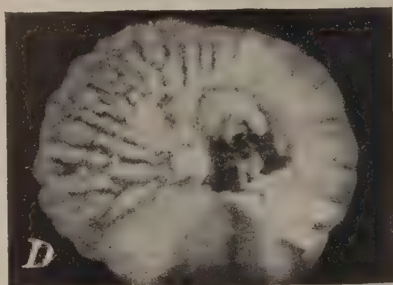

G

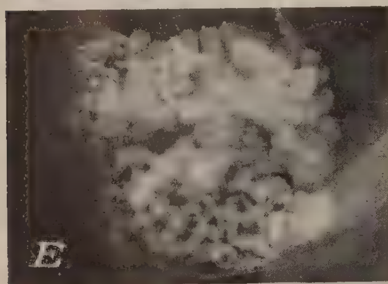

H

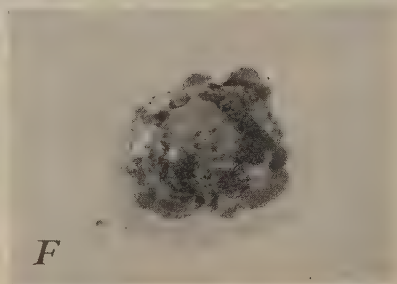

A

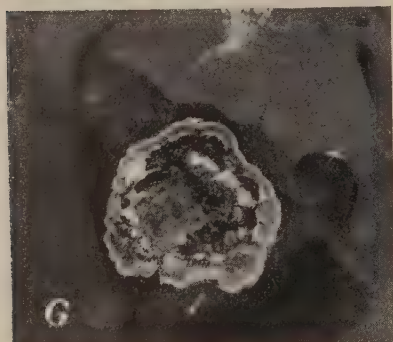

B

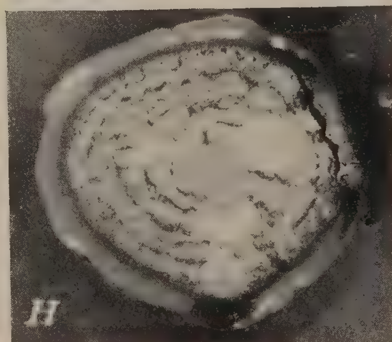

C


D

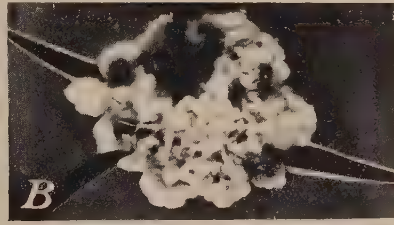

E

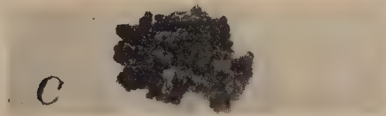

F


G

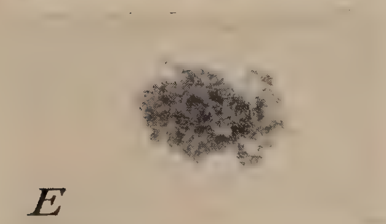

H

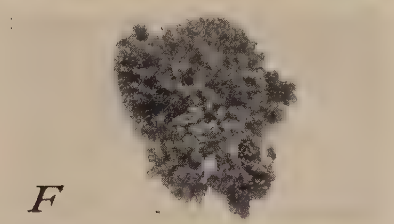

A

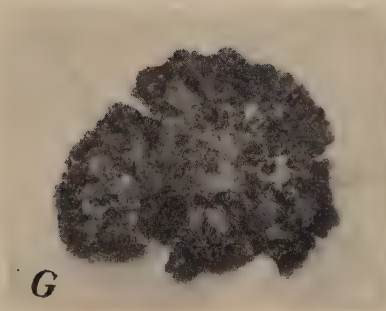

B

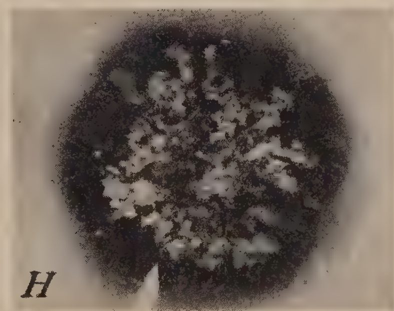

C

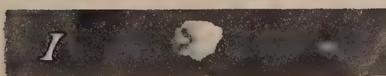

D


E

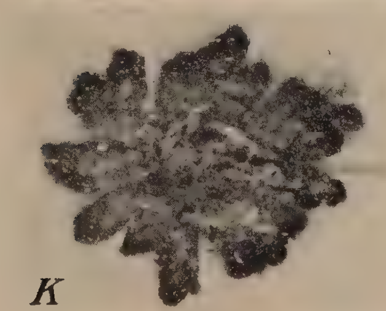

F

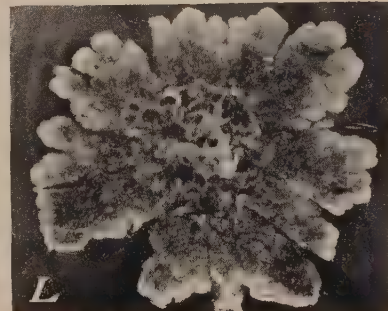

G


H


I


J


K


L

# ALTERAÇÕES CARDIACAS ENCONTRADAS EM CASOS DE PESTE SUINA

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 26-29

Não se conhece, ou pelo menos, ao que parece, não é referida na literatura, a existencia de alterações inflamatorias no miocardio de suinos atacados de peste.

Dentre numerosas pesquizas anatomo e histopatologicas da peste suina, só conseguimos assinalar observações sobre alterações cardiacas, em um trabalho de WALDMANN (9) que, estudando as lesões organicas encontradas em grande numero de suinos infectados experimentalmente, referiu o encontro de alterações degenerativas do musculo cardiaco.

Em *nossas pesquizas histologicas* levadas a efeito em corações de animais pestosos, conseguimos assinalar, em alguns casos, ao lado de processos degenerativos, nitidas alterações inflamatorias, representadas histologicamente até pelo quadro de uma *miocardite intersticial difusa* e, em outros casos, por *alterações granulomatosas localisadas*, todas seguramente consequentes á peste.

Nossas observações são baseadas no estudo anatomopatologico dos corações de 68 suinos portadores de doença espontanea, e de 28 outros, infectados experimentalmente. Destes ultimos, 22, destinados ao fornecimento de virus para o preparo de sôro imunisante, foram sacrificados, em média, entre 8 e 10 dias após a infecção; os restantes morreram naturalmente, da doença.

O material destinado á pesquiza histologica era sistematicamente retirado dos musculos papilares, da parede do ventriculo esquerdo e do septo interventricular, visto termos verificado em alguns casos certa preferencia pela localisação das alterações nessas regiões.

## ALTERAÇÕES MACROSCOPICAS

Na quasi totalidade dos casos examinados encontrámos sinais evidentes de alterações degenerativas do miocardio, representadas por areas de côr amarelada, ás vezes isoladas, outras vezes confluentes e que, associadas a uma fórte hiperemia ou mesmo a pequenas hemorragias, davam ao musculo cardiaco, quando seccionado, um aspéto

semelhante ao do denominado "coração tigrado". Essas alterações sempre apareceram com maior intensidade nos musculos papilares do ventriculo esquerdo, que ás vezes, em consequencia da destruição das paredes vasculares, são séde de hemorragias, de dimensões varias, não ultrapassando porém 2 a 3 milimetros.

São frequentes as hemorragias abaixo do endo e do epicardio. Muito comumente elas se localisam nas auriculetas e em pontos varios das outras porções do epicardio. No endocardio ha em geral preferencia pelas regiões do septo interventricular e musculos papilares do ventriculo esquerdo.

Em numerosos casos, principalmente quando a degeneração parenquimatosa era mais intensa, assinalámos concomitantemente uma dilatação aguda de todo o coração.

## PESQUIZAS HISTOLOGICAS

As alterações que constatámos serão descritas separadamente, em dois grupos: consideraremos as alterações como r e g r e s s i v a s e p r o l i f e r a t i v a s.

a — Focalisemos as primeiras. E' frequente a tumefação turva das fibras, ora disseminada em toda a musculatura ora em pequenas zonas, onde as celulas se mostram fórtemente tumefeitas, intensamente coradas pela eosina e com nucleos de contornos irregulares, tendendo á picnose.

Ha desaparecimento total das estrias. O contorno da fibra aos poucos se torna irregular. O estadio final da degeneração das fibras é representado pela transformação globular do citoplasma, que aparece em massas irregulares e pouco distintas, e pelo desaparecimento do nucleo.

A lise de algumas fibras ou de pequenos grupos delas é regularmente frequente. Mais raramente vimos processos nitidos de necrobiose, em areas ás vezes extensas, dos musculos papilares do ventriculo esquerdo. Em um caso, muito nitido, que tivemos oportunidade de observar, o processo invadira grande porção do musculo papilar. O citoplasma das fibras perdera totalmente a estrutura. Os contornos desapareceram quasi completamente e as celulas apareciam como fundidas umas ás outras, com os nucleos irregulares, picnoticos, e, em numerosos pontos, totalmente lisados.

b — Os processos proliferativos são importantes e representados principalmente por proliferação de fibroblastos e histiocitos nos intersticios, nas porções destruidas e nos espaços conjuntivos, particularmente em torno dos vasos. Aqui observámos, ás vezes, tumefação e proliferação dessas celulas em forma de pequenos granulomas ou

conglomerados muito semelhantes aos conhecidos nodulos de Aschoff, encontrados na miocardite reumatica do homem (Figs. *A* e *B*). Os nodulos eram constituidos por celulas adventiciais fortemente inchadas e proliferadas. Não observámos a formação de gigantocitos.

Ao lado dessas alterações proliferativas aparece mui frequentemente um edema fórte, atingindo intersticios e septos conjuntivos, onde, em alguns casos mais antigos, ha nitido aumento do tecido fibrilar.

Devemo-nos deter nesta questão dos processos proliferativos. E' sabidamente objéto de discussão por parte de varios pesquizadores a questão de si, em determinados tipos de lesão do miocardio, a proliferação conjuntiva é independente ou sucede ás alterações degenerativas das fibras musculares. As teorias são diversas, principalmente no que diz respeito ás miocardites do homem.

Entre os animais a febre aftósa é sem duvida a principal causa de inflamação do miocardio. Uma serie de pesquizadores estudou esta miocardite aftósa, não estando ainda demonstrado de modo nitido si nesse tipo de miocardite a proliferação conjuntiva sucede ou antecede ás lesões degenerativas das miofibras, ou, ainda, si ambas ocorrem concomitantemente.

Com relação ás alterações do miocardio, nossas observações permitem-nos concluir que na peste porcina, a proliferação conjuntiva póde seguir-se ás lesões regressivas, mas pode dar-se tambem o caso inverso, isto é, haver uma proliferação celular independente de alterações aparentemente visiveis, das fibras cardiacas. Assim, observámos em varios casos o aparecimento inicial de alterações regressivas, em outros, de alterações proliferativas e, finalmente, o aparecimento concomitante de ambas.

Devemo-nos ocupar agora da localisação dessas lesões. Conseguimos assinalar a existencia de alterações difusas e focais. As primeiras encontram-se espalhadas em grandes areas do miocardio. Destas alterações vimos tres casos particularmente graves, em que constatámos uma intensa degeneração globulosa e segmentação das fibras, ao lado de forte proliferação de histiocitos não só nos intersticios, como nas porções destruidas, e nitida infiltração por leucocitos eosinofilos, conduzindo ao quadro caracteristico de uma miocardite intersticial difusa não purulenta (Fig. *C*).

Em casos menos graves a degeneração parenquimatosa é de menor grão. Ha pequena destruição de tecido; a proliferação conjuntiva intersticial é acentuada e a reparação das porções alteradas se processa os poucos.

Em casos de decurso mais longo, vimos formação de pequenas cicatrizes, sendo de notar tambem o achado, em um unico caso, de pequena proliferação conjuntiva, num feixe de celulas de Purkinje, fazendo assim supôr a existencia de processos degenerativos ou inflamatorios antigos.

As alterações focais foram encontradas mais raramente. Apareciam sob a fórma de granulomas microscopicos, em geral multiplos, bem circunscritos, e constituidos por fibroblastos fortemente proliferados, tendo algumas vezes pequenas necroses centrais (Fig. *D*).

A falta de alterações degenerativas das fibras cardiacas justapostas estreitamente ao tecido proliferado, a existencia de fibras conservadas no seio desse tecido e, ainda, a observação de granulomas iniciais, demonstram claramente a existencia de alterações proliferativas independentemente de uma lesão das fibras. A destruição das porções musculares existentes nesses fócos representaria, a nosso ver, não uma lesão inicial, mas uma alteração secundaria, provavelmente consequente á ação fagocitica dos histiocitos.

Uma proliferação, ás vezes intensa, dos nucleos das fibras, foi constatada na maioria dos casos.

Essas alterações descritas, supomos sejam produzidas pela ação do virus, a qual, porém, nem sempre se fez sentir isoladamente. Em tres casos observámos alterações diversas dessas que descrevemos, representadas histologicamente por microabcessos metastaticos, localisados nos musculos papilares do ventriculo esquerdo, e em que as bacterias de associação parecem haver desempenhado um papel preponderante.

Em alguns abcessos o exame microscopico revelou a existencia de colonias bacterianas nas porções centrais. Nas regiões circundantes é intensa a inchação turva das fibras; em alguns pontos ha lise das miofibrilas e necrobiose das celulas. Em um abcesso mais antigo, onde essas alterações eram muito acentuadas, vimos uma intensa infiltração histiocitaria dos intersticios existentes entre as fibras degeneradas. Tromboses vasculares conduzem á formação de intenso edema dos septos e principalmente dos espaços conjuntivos perivasculares.

Alterações do endotelio dos vasos e do endocardio raramente foram encontradas. Das primeiras encontramos um unico caso, representado histologicamente por uma ulceração da parede de uma veia, com reação das celulas endoteliais da circunvisinhança (Fig. *E*). No endocardio assinalámos, em alguns casos, pequenos fócos de proliferação das celulas endoteliais, com infiltração por celulas de tipo histiocitario (Fig. *F*).

São frequentes as hemorragias e as proliferações histiocitarias na camada sub-endotelial.

## FREQUENCIA DAS ALTERAÇÕES

Devemos considerar em primeiro plano os casos de doença e morte espontanea. Como já assinalámos, nossas observações foram baseadas no estudo de 68 destes casos. Alterações, quer degenerativas, quer proliferativas, do miocardio, foram encontradas 18 vezes, ou seja em 26% dos casos examinados. Naturalmente devemos referir que nem sempre essas lesões foram assinaladas de modo nitidamente acentuado. Em alguns casos foram mesmo discretas. Um quadro particularmente grave da miocardite intersticial difusa foi encontrado 3 vezes. Em 6 outros encontrámos alterações inflamatorias mais discretas. Foram assinalados, em 3 casos, abcessos metastaticos não unicos, mas multiplos, com localização nitidamente preferencial pelo musculo papilar do ventriculo esquerdo. De modo particularmente nitido, mostraram-se os granulomas em 1 caso e, mais discretamente, em 2 outros. Degenerações graves das fibras musculares chegando á necrobiose de grandes areas, principalmente no musculo papilar do ventriculo esquerdo, foram assinaladas em 3 casos, e cicatrizes tambem 3 vezes. Nos 50 casos restantes não houve ausencia total de alterações. Na grande maioria deles mostraram-se muito frequentes a inchação turva, ás vezes bem acentuada, miolise de grupos de fibras, edema e proliferação histiocitaria discreta nos septos e intersticios, bem como proliferação dos nucleos das fibras. Muito raro foram os casos de ausencia total de alterações.

Nos 22 casos experimentais em que se procedeu ao sacrificio dos animais com poucos dias de doença, houve ausencia quasi completa de alterações, a não ser processos degenerativos ou proliferativos muito pouco acentuados. Em um unico caso foi encontrada uma ulceração da parede de uma veia, aliás unica alteração vascular encontrada em todo o material examinado. Em 6 outros casos experimentais com morte espontanea, as lesões se mostraram bem mais acentuadas.

As alterações do endocardio foram encontradas em 6 casos, entre espontaneos e experimentais.

## RELAÇÕES EXISTENTES ENTRE AS LESÕES ACIMA DESCRITAS E A MORTE SUBITA

Uma comparação entre essas lesões e as assinaladas em casos de morte subita em suinos leva-nos a salientar as semelhanças entre elas observadas.

A origem das mortes repentinas, assinaladas na denominada forma hiperaguda da peste, reside mui provavelmente nessas graves alterações que, no decurso da doença, se desenvolvem no miocardio.

Como causa de morte subita em suinos são tambem muito conhecidas as alterações cardiacas que aparecem nas chamadas formas malignas da febre aftósa, já estudadas por uma serie de pesquizadores. Esta "miocardite aftósa" tem caracteristicos bem conhecidos, prestando-se para o estabelecimento do diagnostico diferencial com outros tipos de inflamação do miocardio.

Assunto de acurados e constantes estudos por parte de varios pesquizadores tem sido, por outro lado, a causa da morte subita em suinos, nas quais se supõe poder excluir a ocurrencia de infecções ou intoxicações. KARSTEN (2), que estudou a questão e considerou primeiramente as observações de GLÄSSER, que atribuiu ao envenenamento pelo milho a causa da morte repentina de suinos, refere casos que teve a oportunidade de observar. Faz considerações ácerca dos dados clinicos, que demonstraram até certo ponto a não contagiosidade da doença; estuda as alterações anatomopatologicas, e detem-se na pesquiza histologica do miocardio, no qual encontra alterações degenerativas associadas a fenomenos proliferativos. Como causa dessas alterações admite KARSTEN principalmente uma alimentação intensiva, unilateral, administrada a animais não submetidos a exercicios ou com vicios de conformação.

Em contraposição ás observações de KARSTEN, pretendeu KRAGE (6) demonstrar a importancia do papel da Pasteurela na genese alterações do miocardio. Assinala KRAGE que os sinais clinicos e anatomopatologicos encontrados no decorrer das formas hiperagudas de septicemia hemorragica em carneiros e vitelas são identicos aos observados nos suinos. A esta asserção respondeu KARSTEN afastando categoricamente qualquer possibilidade de incriminação da bacteria bipolar como agente das alterações encontradas nos casos por ele estudados.

NIEBERLE (7), que estudou tambem detidamente o assunto, comparou as alterações com as encontradas na angina pectoris do homem. Para ele, a causa predisponente seria a anemia. A repleção excessiva do estomago, comprimindo o diafragma e tornando muito diminuida a capacidade do musculo cardiaco (angina pectoris diafragmatica) constituiria uma causa provavel. Sob uma segunda possibilidade, seriam as alterações, em virtude da repleção anormal do estomago, consequencia da excitação do vago, que agiria reflexamente sobre as coronarias, dando origem a graves perturbações circulatorias no musculo cardiaco. Por outro lado, a administração intensiva de

alimentos proteicos e uma falta de movimentação dos animais, favoreceriam o aparecimento da lesão.

A questão foi ainda objéto de pesquizas mais recentes de KARSTEN (4), que passou a admitir tambem, como causa essencial das alterações, perturbações circulatorias com séde no musculo cardiaco.

Segundo PALLASKE (8) deveriam ser incriminadas varias causas, como falta de movimento, máo arejamento das pocilgas, erros de alimentação, calor excessivo e sobretudo excesso de alimentação e engorda rapida.

Em trabalho recente relata HUPKA (1) e encontro de alterações do musculo cardiaco associadas ao aparecimento, na musculatura do corpo, de áreas de aspéto semelhante ao denominado "carne de galinha".

HUPKA considera todas as possiveis causas do desenvolvimento das lesões e admite como mais provaveis os processos infecciosos ou toxicos. Assina que, a favor de uma infecção, falam a frequencia da doença numa mesma criação, a rapida disseminação, e o aparecimento de novos casos em suinos recentemente juntados aos demais. Lembra a possibilidade de se tratar de uma doença de virus. Por outro lado, a falta de febre nos animais doentes e a grande semelhança das alterações com a degeneração muscular observada na paraplegia hemoglubinurica do cavalo, fazem pensar numa intoxicação.

Do exposto se conclue que a questão da morte subita de suinos ainda não está totalmente esclarecida. Si, de um lado, varios pesquizadores pretendem demonstrar a não infecciosidade da molestia, outros mostram-se francamente propensos a considera-la de origem infecciosa. O mesmo se dá com a questão da contagiosidade. As opiniões são, portanto, diversas, mas é de considerar, tambem, a possibilidade de não se tratar de um unico agente responsavel. Por este motivo é que lembramos a possibilidade de ser o virus da peste, que, como foi demonstrado, é capaz de produzir alterações graves no miocardio, o agente de certos casos de morte subita, tomados como desenvolvidos sem causa explicavel ou, pelo menos, por causa obscura. E' de interesse referir que algumas vezes encontrámos, em animais mortos de peste, como unicas alterações anatomopatologicas, as lesões do miocardio. Devemos por fim tomar em consideração a semelhança entre as lesões descritas em casos de morte subita e as que encontrámos na peste. Os casos em que assinalámos alterações muito graves, como a miocardite intersticial difusa, não foram, como referimos, mui frequentes; no geral, eram as lesões mais discretas: áreas de degene-

ração das fibras com proliferação de fibroblastos e histiocitos, alterações, essas, identicas ás encontradas nos casos de morte repentina.

CONCLUSÕES

No presente trabalho relatámos os resultados das pesquizas histologicas efetuadas em corações de suinos mortos de peste, as quais revelaram, em varios casos, a existencia de alterações inflamatorias que ainda não haviam sido descritas.

Considerando a semelhança dessas alterações com as assinaladas em casos de morte repentina em suinos, sugére-se a possibilidade de ser o virus da peste o responsavel por certos casos de morte subita, considerados como desenvolvidos sem causa perfeitamente explicavel.

HEART LESIONS FOUND IN CONNEXION WITH SWINE FEVER

*Abstract*

*Histological examinations of the heart have been made in 68 animals which died of spontaneous swine fever.*

*Eighteen of these animals presented clearly developed degenerative and proliferative changes of the heart muscle.*

*In 3 cases a diffuse interstitial myocarditis of a non suppurative character was seen. The microscopic picture was that of a globular degeneration of the muscle fibers with a proliferation of histiocytarian cells and infiltration by eosinophiles. Six other animals presented signs of an intersticial myocarditis developed only to a rather low degree.*

*Multiple microscopic granulomas distinctly defined and formed by histiocytarian cells in a state of intense proliferation, were found in three other cases.*

*Heavy degenerations of the muscle fibers, sometimes reaching a state of necrobiosis of large areas, were encountered three times; twice in association with inflamatory lesions.*

*Multiple metastatic abcesses with preferential localization on papillary muscle of the left ventricle were verified in three other animals.*

*The 50 other cases under examination were not always completely free from alterations of the heart muscle, but these in the majority of the animals observed were only slight.*

*Besides these cases 28 animals with experimentally induced swine fever were examined showing only weakly developed histological changes of the heart muscle.*

*Inflamatory symptoms of the endocard were observed in 6 cases, as well spontaneous as experimentally.*

*An ulceration of the wall of a vene was seen in a single experimental case, this being the unique vascular change in our whole material.*

*The described changes of the myocard are similar to those observed in some cases of sudden death in swine. The possibility is therefore suggested of the swine fever virus to be responsable for a certain number of sudden deaths, apparently without a sufficient explanatory cause.*

BIBLIOGRAFIA

1 — HUPKA, E. — 1939 — Seuchenhaft auftretende hühnerfleischähnliche Muskelentartungen unter den Schweinen. *D.T.W.* 47, 242-244.

2 — KARSTEN — 1931 — Über die vielörtliche Herzmuskelentartung bei Schweinen. *D.T.W.* 39, 338-340.

3 — KARSTEN — 1931 — Über die vielörtliche Herzmuskelentartung bei Schweinen. *D.T.W.* 39, 472.

4 — KARSTEN — 1937 — Der plötzliche Herztod bei Schweinen. *Ztschr. f. Schweinezucht.* 44, n.º 48.

5 — KIRCH, E. — 1927 — Pathologie des Herzens. *Ergebnisse allg. Pathologie.* 22, 1-206.

6 — KRAGE, P. — 1937 — Über die vielörtliche Herzmuskelentartung bei Schweinen. *D.T.W.* 39, 471-472.

7 — NIEBERLE, K. — 1934 — Zur Frage des plötzlichen Herztodes bei Schweinen und seiner Entstehung. *T.R.* 40, 365.

8 — PALLASKE — 1938 — *T.R.* Ref. B.M.T.W. 1939. 741.

9 — WALDMANN, O. — 1929 — Le diagnostic de la peste porcine. *Of. intern. Epizooties.* 30, 3.737.

———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 26

Fig. *A* — Nodulo histiocitario junto á parede de um vaso.
Fig. *B* — Proliferação de histiocitos em forma de nodulo semelhante aos de Aschoff.

### Estampa 27

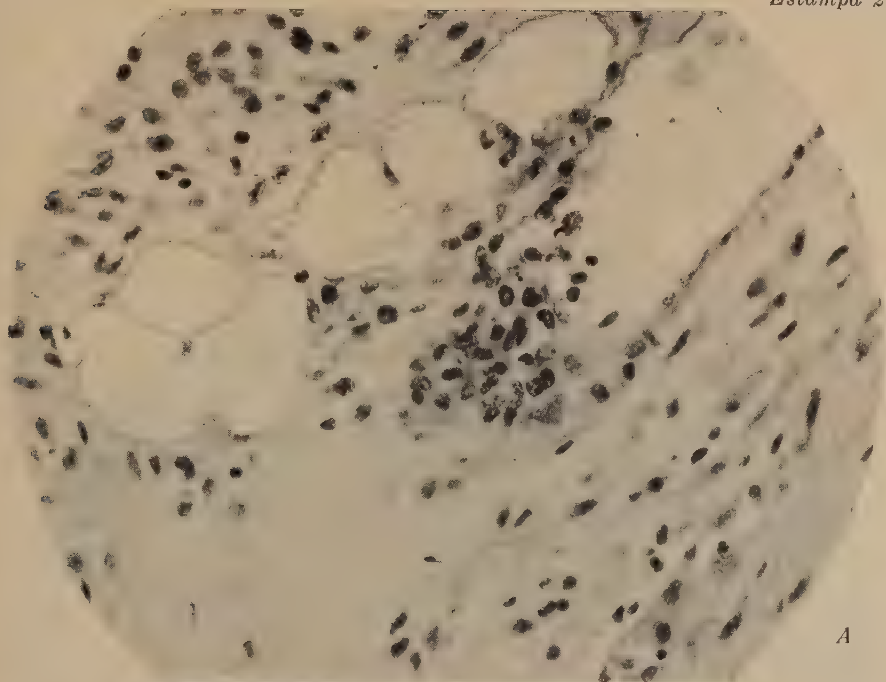
Fig. *C* — Quadro tipico da miocardite intersticial difusa, não purulenta.

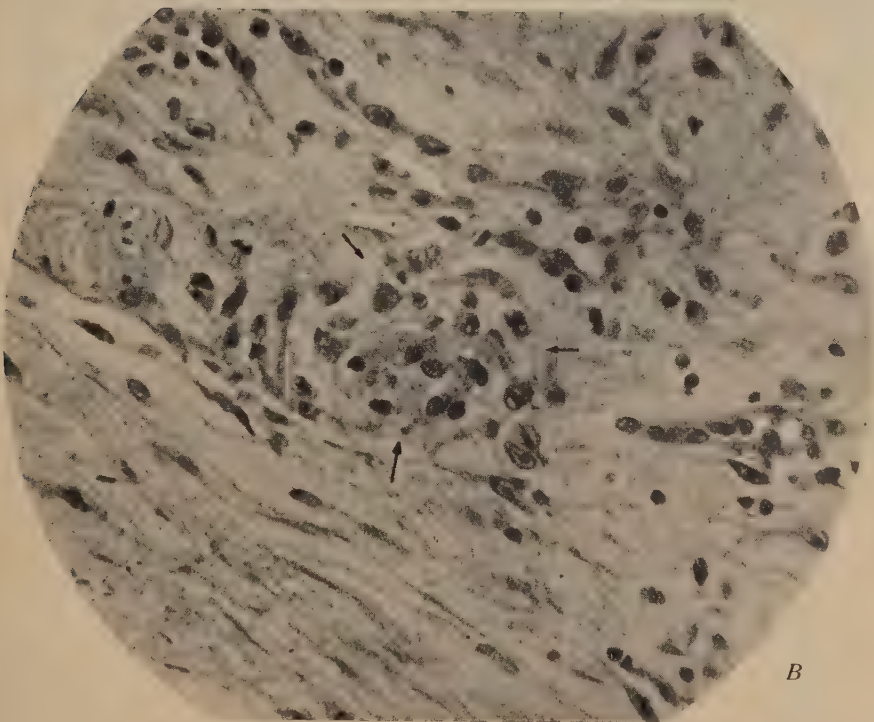
### Estampa 28

Fig. *D* — Granuloma constituido por celulas histiocitarias fortemente proliferadas.

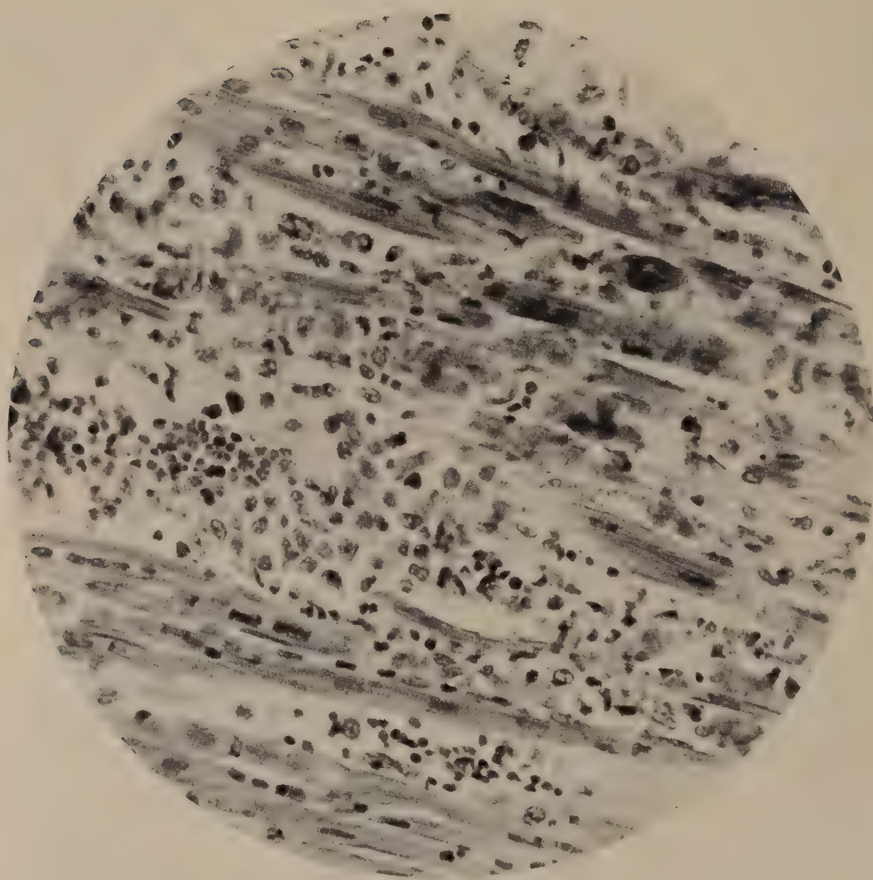
### Estampa 29

Fig. *E* — Ulceração com formação de pequeno trombo, na parede de uma veia.
Fig. *F* — Fóco de proliferação de celulas endoteliais e infiltração por histiocitos no endocardio.

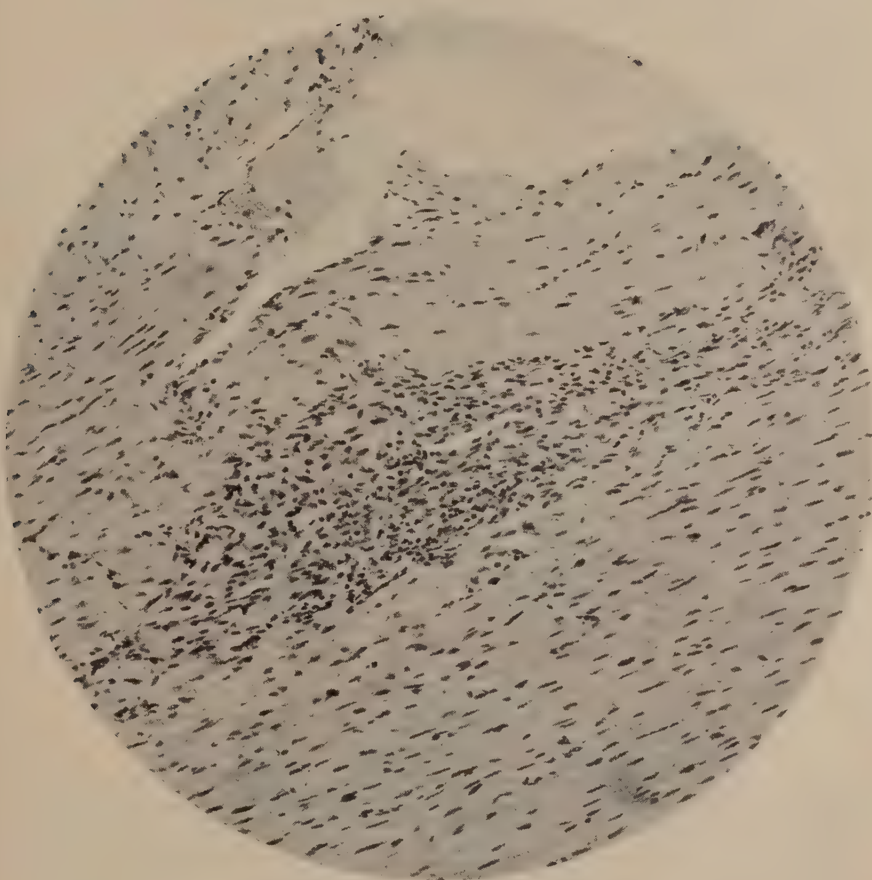

A


B

Arq. do Inst. Biologico, Vol. 11
Estampa 27

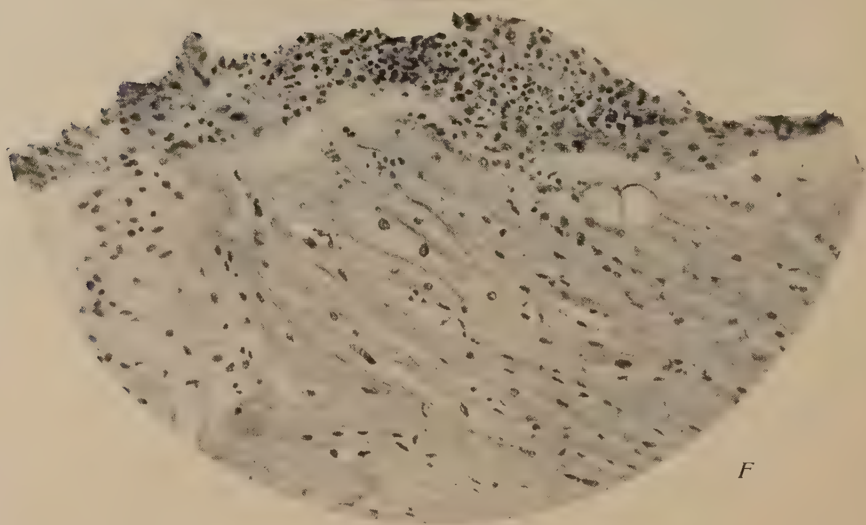


C



D

E



# IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO COLI-AEROGENES EM AVES

## DISTRIBUIÇÃO E FREQUENCIA

POR

R. C. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Numerosos são os trabalhos encontrados na literatura, sobre as bacterias do grupo *coli-aerogenes;* no entanto as pesquisas têm-se caracterisado pela frequencia das fontes utilisadas, tais como fezes humanas, leite, solo e agua.

Com relação aos animais, as investigações aparecem mais reduzidas. LOWELL (10) utilisou fezes de bovinos doentes, MALCOLM (13) usou leite e fezes de bovinos, KOSER (9), amostras do solo, agua, fezes de animais domesticos e de laboratorio; MITCHEL e LEVINE (14), estudando a diferenciação dos tipos do grupo *coli-aerogenes,* utilisaram tambem amostras isoladas de galinhas; no entanto não encontramos nenhum trabalho que faça referencias especiais a estes animais ou ás aves em geral.

Embora os componentes do grupo *coli-aerogenes* sejam geralmente saprofitas, sendo o seu encontro no sangue e nos orgãos considerados por muitos autores como proveniente de uma invasão agonica ou postmortal, potencialmente são patogenicos. Em aves já têm sido verificados muitos casos em que o *B. coli* é incriminado como responsavel por mortes. Conquanto a doença seja de rara ocorrencia e de pequena significação pratica, ás vezes apresenta carater epizootico, produzindo grandes perdas, como verificamos recentemente.

De outro lado, o conhecimento de amostras patogenicas é de grande interesse, principalmente no caso das de origem bucal, quando se processa o reconhecimento de portadores de cólera aviaria.

Nestes casos, em que ha necessidade de inocular material da boca de galinha em pombos, temos observado mortes destes, sem que a *P. avicida* seja incriminada como responsavel, conseguindo-se somente culturas puras dos bacilos *coli-aerogenes.*

### CLASSIFICAÇÃO

Embora sejam muito numerosas as investigações sobre as bacterias do grupo *coli-aerogenes,* consideraveis são as diferenças notadas nas inumeras classificações apresentadas, havendo sempre

uma grande discordancia na escolha das provas principais para a caracterisação dos diversos tipos.

Atualmente a tendencia geral é para a redução do numero de reações utilisadas na diferenciação dos tipos, pois desse modo estes serão menos numerosos e de mais facil identificação.

MAC CONKEY (12), usando nove provas que julgou de importancia, conseguiu diferenciar 128 tipos.

BERGEY e DEEHAN (4) empregam oito reações (sacarose, dulcita, adonita, inulina, gelatina, indol, mobilidade e VP) e de todas as combinações possiveis entre esses caracteres reconhecem uma possivel existencia de 256 variedades do *B. coli.*

ROGERS e cols. (18-19-20-21) reafirmam o valor da diferenciação dos tipos pela relação do $CO_2$ e $H_2$ produzidos nas fermentações, e nessa base determinam dois grupos de organismos coliformes: os que produzem baixa relação *(B. coli)* e os de alta relação *(B. aerogenes).*

Por meio de um indicador, o vermelho de metila, CLARK e LUBS (5) apresentam a prova do VM para distinguir os tipos de alta dos de baixa relação.

MACKIE (11) considerou a fermentação da lactose e de outros hidratos de carbono, como tendo pequena significação, emquanto julgou de grande importancia a inosita e a reação do indol. Admitindo que todos os membros saprofitas do grupo coli-tífico, fermentadores da glicose, fossem considerados como pertencentes aos organismos coliformes, ele incluiu no grupo os *paracolon,* que são organismos cujos caracteres gerais lembram os do grupo *coli-aerogenes,* porem não fermentam a lactose.

SANDIFORD (24) denomina *paracolon* a um grupo de bacterias, cujas culturas lembram o *B. coli,* porém não observa a fermentação da lactose, ou então observa fermentação atipica. Do mesmo modo não assinala a aglutinação pelo sôro paratifico. Das amostras que estudou, mais de 50%, fermentaram com ou sem gás a lactose, em 5 a 14 dias.

KOSER (9), estudando amostras do grupo *coli-aerogenes* isoladas de fezes humanas, de fezes de animais e do solo, usou como caracteres diferenciais o citrato, o acido urico e as provas de VM e VP. Confirma os resultados anteriormente obtidos (18) verificando que o tipico *B. coli* (VM + e VP —) de origem fecal é incapaz de utilisar o citrato como unica fonte de carbono, emquanto os *aerogenes-clocae* (VM — e VP +) que são frequentes no solo, utilisaram o citrato. Algumas exceções foram verificadas na correlação frequente entre as provas de VP e a capacidade de utilisar o citrato. O fato dessas bacterias, classificadas como *B. coli,* apresentarem alguma semelhança com

o *B. aerogenes*, deu ensejo a que fossem denominadas "intermediarios". As discrepáncias notadas baseavam-se no fato das bacterias com caracteres do *B. coli*, somente utilisaram o citrato quando provinham do solo. Esse trabalho trouxe uma otima contribuição ao estudo da distribuição do grupo *coli-aerogenes* na natureza e demonstrou ainda que nem todas as amostras desse grupo, que produzem VM positivo, são de origem fecal.

BERGEY (3), tomando por base a fermentação da lactose, divide o grupo em dois generos: o *Escherichia* (VP —), que é subdividido em 22 especies, e o *Aerobacter* (VP +), subdividido em 7 especies.

WERKMAN e GILLEN (28), na base da produção do trimetileno glicol, propõem a creação de um novo genero separado, entre o *B. coli* e o *B. aerogenes:* o genero *Citrobacter*.

TITTSLER e SANDHOLZER (26) estudam amostras que produzem VM + e VP — e na base da utilisação do citrato, $H_2S$, fermentação da celobiose e alfa-metilglucoside, dividem essas amostras em 6 grupos maiores. Levando em consideração a mobilidade, o indol e a fermentação de outros hidratos de carbono, consideram ainda a existencia de 25 subgrupos. Concluem pela heterogenicidade do grupo e verificam não existir nenhum caracter capaz de diferenciar todos os generos *Escherichia* e *Aerogenes*. Consideram ainda que a inclusão dos intermediarios em um genero separado será dificilmente justificavel.

MITCHELL e LEVINE (14) estudam a utilisação do acido nucleico e os produtos de sua degradação pelas bacterias do grupo *coli-aerogenes*. Os resultados concordam como os de VOGES PROSKAUER, citrato, $H_2S$ e Indol, justificando a colocação dos "intermediarios" em um genero separado: o *Citrobacter*. Verificaram que 90% dos intermediarios dão reação identica ao *Citrobacter froeundii*, a especie tipo do genero *Citrobacter*.

Como provas diferenciais e fundamentais na classificação do grupo *coli-aerogenes* em *coli*, *intermediario* e *aerogenes*, PARR (16) usou quatro reações: Indol — VM — VP — Citrato. Afim de gravar mais facilmente a ordem das reações de cada genero, PARR (15) propoz um meio mnemonico que denominou "IMVIC". Assim pode-se ter uma formula para o organismo em questão. Para o *coli* a formula será (+ + — —) Indol +, (I), VM + (M), VP — (V) e Citrato — (C); e o *aerogenes* terá como formula (— — + +).

PARR (17) definiu os intermediarios como sendo os organismos do grupo *coli-aerogenes* que têm um ou mais caracteres do *coli* e um ou mais caracteres do *aerogenes*, produzindo as formas fecais tipicas

$H_2S$. Para o *coli* os caracteres essenciais são o VM + e a produção do indol; ao passo que o *aerogenes* se caracterisa pelo VP + e citrato +.

MALCOLM (13) reconhece a variedade de tipos do grupo *coli-aerogenes*, mas opina pela inclusão de todos os generos em um só, dadas as estreitas relações existentes entre seus caracteres. Para facilitar a identificação dos tipos, esse autor acha que o grupo pode ser dividido em subgrupos na base do VP, citrato, inosita e indol.

STUART e cols. (25), na base do indol e VP, classificam os organismos do grupo *coli-aerogenes* em tres grupos maiores (*Aerobacter-Intermediario* e *Escherichia*) que são subdivididos em 6 tipos cada um, usando mais tres reações: VM — Citrato e Celobiose.

A complexidade que apresenta o grupo *coli-aerogenes* tem sido evidenciado por diversos pesquisadores TITTSLER e SANDHOLZER (26), PARR (16), MALCOLM (13).

A nossa classificação foi baseada no "IMVIC" proposto por PARR (16), pois, sendo mais simples, abrange as reações que mais têm sido usadas nas investigações do grupo *coli-aerogenes*. PARR (16), justificando a escolha das quatro reações, expõe uma lista de 17 autores que trabalharam com o grupo *coli-aerogenes* e que na maioria utilisaram as reações referidas, assim o citrato foi usado 17 vezes, o indol 12, o VP 15 e o VM 16. Tal fato é mais um indice de especificidade dessas reações para o grupo *coli-aerogenes*, justificando portanto a sua escolha. A combinação dos quatro caracteres que compõem o "IMVIC" fornece 16 tipos diferentes, que já foram identificados por diversos autores, com exceção das formas (+ — — — e + — + —). Em nossas pesquisas conseguimos identificar 8 tipos dos estabelecidos pela combinação dos quatro caracteres do "IMVIC".

## MATERIAL E METODOS

As amostras utilisadas neste trabalho foram isoladas de animais recebidos para a necropsia, ou de aves que foram submetidas a pesquisa para o reconhecimento de portadores de cólera. Em qualquer caso porém, deve ser notada a grande variedade de proveniencia dos animais examinados.

No presente trabalho ocupar-nos-emos somente da parte referente à distribuição e frequencia, ficando as pesquisas sobre a patogenicidade para serem estudadas posteriormente. Tendo em vista verificar a origem das bacterias encontradas em aves sãs e após a morte, resolvemos isolar as amostras do figado, boca, duodeno e reto.

O material foi sempre semeado em placas de agar sangue a 1% e em TEAGUE. Destas ultimas eram retiradas as colonias, que cultivadas em caldo simples, depois de 24 hs. a 37°C, eram submetidas ás seguintes provas: coloração de GRAM, mobilidade, fermentação da lactose, glicose, manita, sacarose, maltose, dulcita e salicina; produção de indol, crescimento no meio de citrato de KOSER, reações de VOGES PROSKAUER e vermelho de metila, produção de $H_2S$, liquefação da gelatina e crescimento no meio de MAC CONKEY, leite simples e tornasolado. As provas utilisadas pelo complexo "IMVIC" foram pesquisadas da seguinte forma:

Indol — A pesquisa do indol foi feita em culturas de 24 hs. a 37°C em caldo HOTTINGER, ou em agua de peptona, usando-se o reativo de EHRLICH.

MALCOLM (13) empregou o reativo de EHRLICH, porém usa culturas em agua de peptona (WITTE ou FAIRCHILD) com uma incubação de 10 dias a 37°C.

WILSON e cols. (29) empregam culturas em agua de peptona, com uma incubação de 5 dias a 37°C, mas acham muito provavel que 3 dias de incubação sejam suficientes.

TOLEDO MELLO (27), fazendo estudos comparativos entre os processos de EHRLICH e JOLLES para a pesquisa do indol, verifica ser a prova de EHRLICH suficientemente sensivel em culturas de 24 a 48 hs., tanto em meios com peptona de WITTE como com bactotriptona DIFCO, ao passo que a reação de JOLLES, embora bastante sensivel e persistente, pode dar resultados positivos em tubos de agua de peptona de WITTE não semeados.

STUART e cols. (25) pesquisam o indol com uma incubação de 24 hs. com reagente de KOVACS, com bons resultados.

VP e VM — As reações do VP e VM foram feitas com o meio proconizado por CLARK e LUBS (agua 1000 cc. peptona de WITTE 5 grs., glicose 5 grs. e fosfato de potassio 5 grs.) e pela tecnica de BARRIT (2). As culturas foram incubadas a 37°C, durante 48 hs., e a leitura feita após uma hora em temperatura ambiente.

Nos casos em que as reações não tiveram correspondencia negativa, as provas foram repetidas, usando-se culturas de um até 6 dias.

Citrato — Esta prova foi feita em meio de citrato de KOSER (9), sendo as inoculações feitas diretamente de culturas em agar, e os tubos incubados a 37°C. As reações positivas foram determinadas por uma forte turvação, sempre comparada com um tubo não semeado mas incubado. As observações de crescimento foram feitas de um a

sete dias com intervalos de 24 hs. No caso de resultados negativos, a prova foi repetida, ficando os tubos até 15 dias a 37°C.

As provas adicionais ao complexo "IMVIC" foram feitas da seguinte maneira:

Mobilidade — A mobilidade das bacterias foi determinada em gota pendente, usando-se culturas de 24 hs. em caldo simples. Este processo entretanto deu resultados duvidosos, em muitos casos. Nestes, o metodo usado foi o da semeadura por agulha, em agar a 3 ‰ o que surtiu resultados bem precisos.

Meio de Mac Conkey — Este meio foi preparado de acordo com a tecnica exposta por WILSON e cols (29). No uso do caldo MAC CONKEY é entretanto de capital importancia a temperatura do banho-maria, a qual deve ser regulada rigorosamente. A temperatura aconselhada, de 44°C, refere-se ao meio, razão pela qual deve-se preferir a incubação em banho-maria.

WILSON e col. (29) estudaram o comportamento dos bacilos *coli-aerogenes* em meios de EIJKMAN e MAC CONKEY; e observando o crescimento em diferentes temperaturas, verificaram que 42°C foi uma temperatura relativamente muito baixa, permitindo que algumas amostras de *aerogenes* formassem gás. A 46°C verificaram ser uma temperatura muito elevada, inhibindo muitas amostras de *coli* de formarem gás, e mesmo de crescerem.

Para os meios de EIJKMAN, WILSON e col. regularam os incubadores para uma temperatura de 43 a 45°C enquanto LEVINE e cols. recomendam uma temperatura de 43 a 44°C. Nós usamos banho-maria regulado a uma temperatura de 43 a 45°C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fermentação dos assucares — Os resultados obtidos nestas provas acham-se expressos na tabela 1.

TABELA 1

Fermentação de carbohidratos por amostras do grupo *coli-aerogenes* de origem aviária

| Tipo | Numero de Amostr. | Porcentagem de amostras produzindo acido e gás | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Glicose | Manita | Sacarose | Lactose | Maltose | Dulcita | Salicina |
| *Coli* . . . . . . . . | 163 | 99,4 | 99,4 | 73,5 | 100 | 99,4 | 74,7 | 82,7 |
| *Interm.* . . . . . . | 44 | 100 | 100 | 80,9 | 100 | 100 | 69 | 88 |
| *Aerogenes* . . . . . | 9 | 100 | 88,9 | 88,9 | 100 | 88,9 | 44,5 | 88,1 |

Indol — Os resultados obtidos com caldo HOTTINGER e agua de peptona (WITTE) corresponderam-se plenamente, somente não havendo concordancia em tres amostras: A. 213 — A. 12 — A 207.

As amostras A 213 e A 12 somente depois de 10 dias produziram indol no caldo HOTTINGER, enquanto na agua de peptona deram resultados negativos. A pesquisa pelo metodo de GNEZDA (7) deu resultado negativo até 10 dias, o que faz parecer bastante provavel que a reação positiva obtida pelo metodo de EHRLICH tenha sido determinada pela presença do alfa-metil indol. A amostra A 207, em agua de peptona, deu resultado positivo em 24 hs., ao passo que em caldo HOTTINGER, somente depois de 5 dias. Submetida á prova de GNEZDA, não revelou tambem o indol, ficando portanto em identicas condições das amostras A 213 e A 12.

VP e VM — A correlação negativa entre as provas VM e VP é muito frequente e já tem sido demonstrada por diversos autores. Entretanto muitas amostras já têm sido encontradas, produzindo uma reação dupla, positiva ou negativa.

A existencia da dupla reação positiva ou negativa tem sido incriminada como resultante da mistura de amostras.

WILSON e col. (29), encontraram em 496 amostras, 37 com dupla reação positiva e 5 com negativa. Das 37 com reação positiva, depois de purificadas, somente uma provou ser de fato uma amostra mixta, contendo *aerogenes* e *intermediario*. Das cinco amostras que apresentaram dupla reação negativa, somente tres continuaram apresentando VP — e VM — depois de purificadas.

PARR (16), trabalhando com fezes humanas, não conseguiu confirmar a existencia de amostras mixtas no caso da dupla reação positiva.

RUCHHOFT e col. (23) admitem tambem a existencia de amostras mixtas.

Em nossas pesquisas encontrámos 10 amostras produzindo a dupla reação positiva, sendo 7 nas amostras da boca, 1 nas do figado, 1 nas do duodeno e 1 nas do reto. Dessas amostras, só conseguimos fazer novas pesquisas em 8, pois 2 foram perdidas. Das 8 amostras que sofreram novas provas, 3 deram reações do *coli*, duas do *aerogenes*, uma não foi dissociada, continuando a produzir a dupla reação positiva, e 2 foram dissociadas: uma em *coli* e *aerogenes* e outra em *coli*, *aerogenes* e *intermediario*.

Mac Conkey — WILSON e cols. (29), comparando o crescimento do *B. coli* no meio de EIJKMAN (modificado por WILLIAM, WEAVER e SHERAGO — 1933) e no caldo de MAC CONKEY a 44°C, concluiram pela preferencia deste ultimo.

BARDSLEY (1) demonstra a especificidade do MAC CONKEY a 44°C para o Coli I (+ + — —) e Irregular II (— + — —); assim, em 2840 amostras estudadas, somente 15 produziram gás nesse meio, e não puderam ser classificadas como coli I ou irregular II.

De outro lado, verificou ainda que somente 6 amostras, num total de 1086 do grupo I. A. C., reagiram positivamente a esta prova.

Em nossas pesquisas sobre um total de 216 amostras os resultados obtidos nos tres generos foi o seguinte: no genero *Coli* foram pesquisados 163 amostras, dessas, 154 foram do tipo (+ + — —) 120 produziram gás e 34 não o produziram. Do tipo (— + — —) foram pesquisadas 9 amostras, 5 das quais produziram gás e 4 deram resultados negativos. Das 44 amostras do genero *intermediario*, 30 produziram gás, sendo 22 destas, do tipo (+ + — +). De 9 amostras *aerogenes* somente uma produziu gás.

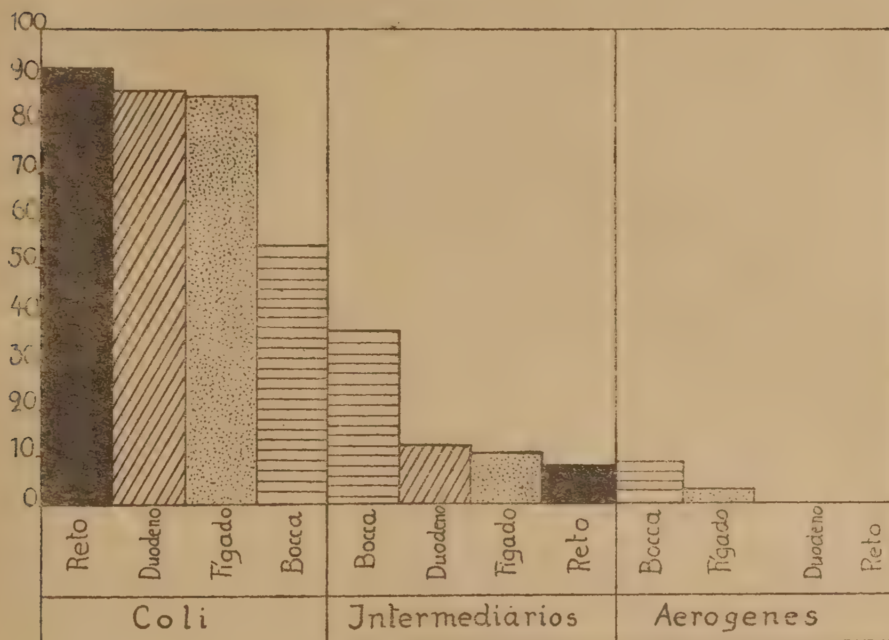
Complexo IMVIC — A distribuição e frequencia dos tres generos: *coli*, *intermediarios* e *aerogenes*, nas fontes utilisadas, ou seja figado, boca, duodeno e reto, pode ser observada na tabela 2 e grafico 1.

TABELA 2

Distribuição e frequencia dos bacilos *Coli-Aerogenes* em aves

| Grupo Coli-Aerogenes 216 amostr. | Tipos | N. de Amostr. por tipos | % por tipos | Figado 59 amostras | | Boca 82 amostras | | Duodeno 39 amostras | | Reto 36 amostras | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | N.º de amostr. | % | N.º de amostr. | % | N.º de amostr. | % | N.º de amostr. | % |
| *Coli* . . . | + + − − | 154 | 71,2 | 49 | 83,2 | 39 | 47,6 | 33 | 84,6 | 33 | 91,7 |
| | − + − − | 9 | 4,2 | 2 | 3,3 | 6 | 7,3 | 1 | 2,6 | 0 | 0 |
| | Total . . | 163 | 75,4 | 51 | 86,5 | 45 | 54,9 | 34 | 87,5 | 33 | 91,7 |
| *Intermed.* | + + + − | 2 | 0,9 | 0 | 0 | 1 | 1,2 | 0 | 0 | 1 | 2,8 |
| | + + − + | 28 | 13 | 2 | 3,3 | 20 | 24,4 | 4 | 10,2 | 2 | 5,5 |
| | − + − + | 6 | 2,8 | 3 | 5,3 | 3 | 3,7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + + + + | 3 | 1,4 | 1 | 1,6 | 1 | 1,2 | 1 | 2,6 | 0 | 0 |
| | − + + + | 5 | 2,3 | 0 | 0 | 5 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total . . | 44 | 20,4 | 6 | 10,2 | 30 | 36,5 | 5 | 12,8 | 3 | 8,3 |
| *Aerogenes* | − − + + | 9 | 4,2 | 2 | 3,3 | 7 | 8,6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total . . | 9 | 4,2 | 2 | 3,3 | 7 | 8,6 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Grafico 1




O *Coli* foi o genero mais frequente em todas as fontes, atingindo 91,7% no reto, 87,2% no duodemo, 86,5% no figado e 54,9% na boca.

A maior frequencia do *coli* faz-nos supôr que a maioria dos bacilos seja de origem fecal, tendo em vista os resultados obtidos por KOSER (9), que demonstrou ser o *B. coli*, tipico, incapaz de utilizar o citrato com unica fonte de carbono. ROGERS e cols. (22) verificam ser o *B. coli* muito abundante em fezes de bovinos, enquanto o *aerogenes* é muito raro, sendo nos grãos dos cereais mais comum o *aerogenes*. MALCOLM (13) verifica tambem que comumente o *B. coli* tipico tem como habitat as fezes. RUCHHOFT e cols. (23) admitem somente quatro tipos de origem fecal: — + — —, + + — —, — + — + e — — + +; as outras formas são consideradas estranhas ou então mixtas.

O fato de termos encontrado entre as amostras da boca 54,9% que não utilisam o citrato, portanto de origem provavelmente fecal, parece estar ligado ao habito que possuem as aves de bicar fezes á procura de alimentos. Nestas condições deve obrigatoriamente a flora bucal desses animais apresentar maior predominancia dos tipos de origem fecal.

A alta porcentagem do *Coli* encontrada no figado poderá ser explicada por uma invasão "post mortem". Os intermediarios apresentaram a seguinte distribuição: boca 36,5%, duodeno 12,8%, figado 10,2% e reto 8,3%.

Dos dez tipos de intermediarios que resultam da combinação dos caracteres do "Imvic" somente 5 foram determinados. Quanto a esses tipos, o que nos parece bastante sugestivo é o fato de 4 deles utilisarem o citrato como unica fonte de carbono, havendo portanto grandes probabilidades de serem todos originados do solo; KOSER (9), o unico tipo (+ + + —) que não utilisou o citrato, não apresentou a correlação negativa da dupla reação do VM e VP, deixando portanto duvidas, pois poderá tratar-se de uma amostra mixta, como verificaram RUCHHOFT e col. (23) e WILSON e cols. (29). A grande porcentagem de *intermediarios* notada nas amostras da boca (36,5%) constitue um fator que vem reforçar a suposição de que as referidas amostras provenham do solo, pois estas geralmente utilisam o citrato. Dos *intermediarios* encontrados, o mais frequente foi a forma + + — + que atingiu 63,6% sobre o total desses tipos. PARR (16) encontra — + — + como o tipo ambos frequente de *intermediarios* em fezes humanas, enquanto o tipo + + — + ocupou o terceiro lugar na frequencia.

O genero *aerogenes* só foi notado nas amostras do figado e da boca e constituiram o genero de menor frequencia, pois atingiu somente 3,3% no figado e 8,6% na boca.

Dos tres tipos de *aerogenes* estabelecidos pelo "IMVIC" somente foi encontrado um — — + +.

O fato de não se encontrar o genero *aerogenes* no reto e duodeno deverá provir de não encontrar o aerogenes condições favoraveis para o seu desenvolvimento num meio já apropriado aos outros generos.

Os nossos resultados concernentes aos *aerogenes* estão de acordo com as observações de ROGERS e cols. (21), que verificaram ser o aerogenes muito raro em fezes de bovinos. Em 150 amostras só obtiveram uma amostra. Em fezes humanas a proporção é geralmente maior, porém varia com o individuo e tambem com certas condições fisiologicas. CLEMESHA (6) verifica que as bacterias que produzem VP são muito raras em fezes, existindo numa proporção que varia de 1 a 2% somente.

## SUMARIO

No presente trabalho é feito um estudo sobre a frequencia e distribuição das bacterias do grupo *coli-aerogenes* em aves. Foram utilisadas 216 amostras, isoladas de animais (principalmente galinhas)

que vieram para necropsia, ou que foram submetidas a pesquisa para a verificação dos portadores de cólera aviaria.

Tendo em vista o estudo da origem das bacterias, foram usadas quatro fontes de isolamento: figado, boca, duodeno e reto.

A classificação foi baseada no complexo "IMVIC" proposto por PARR (16), tendo ainda sido levadas a efeito outras provas adicionais. Conseguimos identificar oito tipos, dos 16 determinados pelo "IMVIC", tendo-se mostrado o genero *coli* com maior frequencia em todas as fontes utilisadas, pois atingiu 86,5% no figado, 54,9% na boca, 87,2% no duodeno e 91,7% no reto.

Os tipos *intermediarios* alcançaram 10,2% no figado, 36,5% na boca, 12,8% no duodeno e 8,3% no reto, tendo sido identificados 5 tipos, dos quais o mais frequente foi o + + — +, atingiu 13% sobre o total das amostras.

Considerados os resultados obtidos por KOSER (9) em estudos sobre a origem das bacterias do grupo *coli-aerogenes*, é provavel que os tipos de *intermediarios* identificados sejam originarios do solo.

O genero menos frequente foi o aerogenes, que atingiu somente 8,6 na boca e 3,3 no figado, não tendo sido encontrado nas amostras do duodeno e reto. Aliás estes resultados estão de acordo com ROGERS e cols. (21) e CLEMESHA (6), que verificaram ser o aerogenes muito raro em fezes.

## DISTRIBUTION AND FREQUENCY OF TYPES THE COLI-AEROGENES GROUP IN BIRDS

*Abstract*

*This paper deals with the identification of the types of coliform micro-organismus occurring in birds. The work is based on the study of 216 strains isolated from the mouth cavity, liver, duodenum and rectum of birds, most of which were common fowls. The strains from liver, duodenum and rectum were obtained from dead specimens brought to the autopsy room for diagnostic purpose. Those from the mouth cavity came principally from live birds belonging to flocks where a search for healthy carriers of fowl cholera was being made.*

*The identification of types was fased on the IMVIC test presented by Parr (16).*

*Eight types out of the sixteen in Parr's scheme have been shown to occur in birds.*

*Bacteria belonging to the coli group are the most frequently found either in the mouth (54,9%) or in the liver (86,5%) and bowels (87,2% in the duodenum and 91,7% in the rectum).*

*The* *intermediate* *types rank next to* *coli* *in frequency: 10,2% in the liver, 36,5% in the mouth, 12,8% in the duodenum and 8,3% in the rectum. Five* *intermediate* *types have been identified, the commonest being the one quoted as + + — +. According to Koser's observations on the correlation of certain biochemical characters with habitat of coliform organisms, we deem probable that* *intermediates* *dealt with in this paper originate from the soil.*

*Representatives of the* *Aerogenes* *group have only been found in the mouth and liver, what is in agreement with the findings of Clemesha and of Rogers and all., showing that* *Aerogenes* *is very rare in stools.*

BIBLIOGRAFIA


1 — BARDSLEY, D. A. — 1938 — A Comparison of two methods of assessing the number of different types of Coliform Organisms in Water. *The Jour. of Hyg.* 38, 309-324.

2 — BARRIT, M. M. — 1936 — The intensification of the Voges Proskauer Reaction by the addition of alpha-naphtol. *Jour. of Path. and Bact.*, 42, 441-454.

3 — BERGEY, K. H. — 1923-34 — Manual of Determinative Bacteriology. London.

4 — BERGEY, *D. H.* and DEEHAN, S. J. — 1908 — Colon-Aerogenes Group of Bacteria. *J. Med. Research*, 19, 175-200.

5 — CLARK W. M. and LUBS, H. A. — 1915 — The differentiation of Bacteria of the Colon-Aerogenes family by the use of indicators. *Jour. Inf. Dias.*, 17, 160-163.

6 — CLEMESHA, W. W. — 1912 — Bacteriology of surface Waters in the tropics — Cit. por Rogers — 1918 — *J. Bact.* 3, 313-354.

7 — COMMITTEE of the S. A. B. — 1937 — Pure Culture Study of Bacteria. 5 (3):9. 6 th. Edition.

8 — KOSESR, S. A. — 1923 — Utilization of the salts of organic acids by the Colon-Aerogenes group. *Jour. Bact.* 8, 493-520.

9 — KOSER, S. A. — 1924 — Correlation of Citrate utilization by Members of the Colon-Aerogenes Group with other Differential Characteristics and with Habitat. *Jour. Bact.* 9, 59-77.

10 — LOWELL, R. — 1937 — Classification of Bacterium coli from diseasea calves. *Jour. of Path. and Bact.* 44, 125-139.

11 — MACKIE, T. J. — 1921 — Trans. Rev. Soc. S. Afr. 9.315. cit. por MALCOLM (1938) *The Jour. of Hyg.* 38, 495-421.

12 — MAC CONKEY, A. — 1909 — Further Observations on the Differentiation of Lactose-Fermenting Bacili, with Special Reference to those of Intestinal Origin. *The Jour. of Hyg.* 9, 86-103.

13 — MALCOLM, J. F. — 1938 — A classification of coliform Bacteria. *The Jour. of Hyg.*, 38, 395-421.

14 — MITCHELL, N. B. and LEVINE, M. — 1938 — Nitrogen availability as an aid in the Differentiation of Bacteria in the Coli-Aerogenes Group. *Jour. of Bact.*, 36, 587-598.

15 — PARR, L. W. — 1936 — Sanitary Significance of the Succession of Coli-Aerogenes Organisms in Fresh and in Stored Feces. *Am. Jour. Publ. Health.* 26, 39-45.

16 — PARR, L. W. — 1938 — Coliform Intermediate in Human Feces. *Jour. of Bact.* 36, 1-15.

17 — PARR, L. W. — 1938 — The Occurrence and Succession of Coliform Organisms in Human Feces. *The Am. Jour. of Hyg.* 27, 67-87.

18 — ROGERS, L. A., CLARK, W. M. and DAVIS, — 1914 — The Colon Group of Bacteria. *J. Inf. Dis.*, 14, 411-475.

19 — ROGERS, L. A., CLARK, W. M. and EVANS, A. C. — 1914 — The Characteristics of Bacteria of the Colon Type found in Bovine Feces. *J. Inf. Dis.*, 15, 99-123.

20 — ROGERS, L. A., CLARK, W. M. and EVANS, A. C. — 1915 — The Characteristic of Bacteria of the Colon Type Occurring on Grains. *J. Inf. Dis.*, 17, 137-159.

21 — ROGERS, L. A., CLARK, W. M. e LUBS, H. A. — 1918 — The Characteristic of Bacteria of the Colon Type Occurring in Human Feces. *J. Bact.*, 3, 231-252.

22 — ROGERS, L. A. — 1918 — The Occurrence of Differents Types of the Colon-Aerogenes Group in Water. *Jour. Bact.*, 3, 313-354.

23 — RUCHHOFT, C. C. e col. — 1931 — Coli-Aerogenes Differentiation in Water Analysis. II. The Biochemical Differential Tests and Their Interpretation. *Jour. Bact.*, 22, 125-181.

24 — SANDIFORD, B. R. — 1935 — The Paracolon Group of Bacteria. *Jour. of Path. and Bact.*, 41, 77-88.

25 — STUART, C. A. e col. — 1938 — Relationships of Coliform Organism. *Jour. Bact.*, 36, 391-409.

26 — TITTSLER, R. P. and SANDHOLZER, L. A. — 1935 — Studies on the Escherichia Aerobacter Intermediates. *Jour. Bact.*, 29, 349-361.

27 — TOLEDO, MELLO J. — 1936 — Apreciações sobre a pesquisa do Indol em biochimica bacteriana. Sep. da *Medicina Pratica*, 7, 350.

28 — WERKMAN, C. H. and GILLEN, G. F. — 1932 — Bacteria Producing trimethylene Glycol. *Jour. Bact.*, 23, 349-351.

29 — WILSON, G. S., TWIGG, R. S., WRIGHT, R. C., HENDRY, C. B., COWELL, M. P. and MAIER, I. — 1935 — The Bacteriological Grading of Milk. *Med. Res. Council*, Special Rep. Series no. 206, p. 153-207, London.

———o———

# QUELQUES COMMENTAIRES AUX RECENTES ETUDES POURSUIVIES DANS LE DOMAINE DE L'ETIOLOGIE DU TRACHOME

PAR

Archimede Busacca, S. Paulo, Brésil

Depuis qu'en 1933, j'ai, le premier attiré l'attention sur la présence de corpuscules à caractéres morphologiques et tinctoriaux de rickettsias dans les tissus trachomateux (épithélium de la conjonctive et du pannus cornéen; nodules trachomateux) (BUSACCA, 1 a) la litérature mondiale a produit bon nombre de travaux sur ce sujet.

On peut retenir que les études faites avec les méthodes morphologiques ont confirmé mon observation, car, comme je le dirai plus loin les objections présentées ne me semblent pas assez bien fondées pour l'infirmer.

Parmis les premiers, CUENOD et NATAF (2 — a, b, c, d,) ont décrit, dans une série de travaux, les mêmes corpuscules dans les tissus trachomateux; toutefois, même dans la partie morphologique, certaines des observations de ces auteurs (comme, par exemple, celle des "plastilles") sont trés discutables, car ils ont réuni dans un groupe unique des éléments hétérogènes entre eux.

Comme confirmation, je retiens encore le travail de THYGESON (20 — a) ou il est dit que le virus du trachome possède certains des caractères des rickettsias, ainsi que ceux de POLEFF (15) et de FOLEY et PARROT (6 — a, b). Je n'ai pris connaissance qu'à travers un bref résumé des recherches de OISHI (11).

Certains de ces auteurs identifient les corpuscules rickettsioïdes avec les corpuscules élémentaires connus des corps de Prowazek; cette question de leur identité ne me semble encore être résolue ni dans un sens ni dans l'autre et il est certain que l'on ne peut envisager comme une donnée fondamentale en faveur de l'identité le fait que certains auteurs n'aient réussi à voir ces corpuscules que dans les cellules épithéliales: ceci, en effet peut trés bien être expliqué par une question de technique.

THYGESON (20-b), désirant s'attribuer le mérit d'avoir reconnu aux agents du trachome des caractéres de rickettsias — THIGESON était rapporteur sur l'étiologie du trachome au Congrés tenu à Madrid en 1933, au cours duquel j'ai, pour la premiére fois, présenté les résultats de mes recherches — n'admet ces dits caractéres que pour les seuls corpuscules par lui repérés dans les cellules épithéliales et émet l'opinion

que j'aurais pris des "débris cellulaires" pour des corpuscules rickettsioïdes. L'on ne parvient pas à comprendre comment, en lisant avec l'attention nécessaire mes articles sur ce sujet — articles dans lesquels j'ai toujours soutenu que j'accordais une grande valeur aux formes intracellulaires alors que j'étais d'avis, au contraire, qu'il ne fallait pas interpréter les extra-cellulaires qu'avec la plus grande circonspection — il puisse être possible de penser que les formations que j'ai vues et fidelement reproduites dans les figures puissent être des "débris".

Mes observations se réferent à des corpuscules observés dans les cellules épithéliales ou dans leurs interstices, non seulement par les méthodes communément employées pour la démonstration des rickettsias, mais encore par l'imprégnation argentique des pièces, suivant JAHNEL (jusqu'à maintenant reprise par personne) ; et une semblable imprégnation, quand elle est bien réussie, donne des images qui ne peuvent être prises ni pour des formations protoplasmiques, ni pour des produits artificiels dus á l'emploi des reactifs. Elles se réfèrent encore à des corpuscules observés dans les cellules épithélioïdes des follicules et dans des éléments réticulo-endothéliaux. Devant tels faits, il me semble que l'hypothèse avancée par THYGESON soit complètement dènuée de fondement.

Les même remarques peuvent être faites au travail de BRALEY (25). Cet A., basé sur des observations qu'il a fait sur les cellules épitheliales de la conjonctive normale et trachomateuse soit colorées, soit examinées en champ obscur, vient à la conclusion que ce que j'ai descrit comme corpuscules rickettsioïdes sont les mitichondries et les granulations de kératine. On comprend bien qu'il n'a pas pri connaissence des figures qui illustrent mon travail, mais, qu'il connait mes recherches seulement a travers le résumé de ma communication au Congrès de Madrid, qu'il cite dans la bibliographie.

Dans de récents articles, FOLEY et PARROT (6- c, d) défigurant un peu la question, tendent à s'attribuer l'identification d'une rickettsia comme étant l'agent du trachome. Ces auteurs retiennent que les rickettsias par eux observées dans les seules cellules épithéliales ne sont autre chose que les corpuscules élémentaires des corps de Prowazek, et tout en reconnaissant que ceux qu'ils décrivent sont des rickettsias, ils se refusent à admettre que les miens en soient. Ils en arrivent ainsi au point de ne faire absolument aucun état, dans un de leurs récents travaux, d'aucune de mes études, et de revendiquer (6-d) une priorité qui, sans contredit, ne leur appartient pas ainsi du reste, que leur a fait remarquer PAGES (13) au cours d'une discussion.

GRUETER (7) voudrait que les corpuscules rickettsioïdes ne soient autre chose que des fragments de l'appareil réticulaire interne de Golgi.

A mon sens, cette supposition n'a pas non plus de fondement car elle n'explique pas les observations par moi faites, surtout avec les méthodes d'imprégnation argentique, dans les tissus trachomateux. Ni les corpuscules intra-cellulaires ou inter-cellulaires repérés por moi dans les cellules épithéliales, ni ceux des cellules des nodules trachomateux ne peuvent avoir aucun rapport avec l'appareil de Golgi ou avec ses modifications.

Moins fondée encore est l'objection de JOHN et HAMBURGER (9) auteurs qui, n'ayant jamais vu de corpuscules rickettsioïdes dans leurs cultures à la Carrel, pensent que j'ai confondu les granulations des "mastzellen" avec les dits corpuscules. La différence morphologique entre ces deux formations est des plus évidentes et je ne doute pas que, si ces auteurs avaient vu une préparation typique de rickettsias ou les figures annexées au chapitre "Rickettsien" de KOLLE et WASSERMANN la possibilité d'une telle confusion ne leur serait pas même venue à l'esprit. Dans mon étude sur les corpuscules rickettsioïdes (1-b), parlant de la différenciation des autres formations, j'ai pris en considération les mitochondries, les granulations azzurrophyles, les gonflements le long des ponts inter-cellulaires des cellules épithéliales; j'ai envisagé la possibilité de l'existence, dans les nodules trachomateux, de mégacaryocytes (quoique jamais ils n'aient été vus ni par moi, ni par d'autres), avec les fines granulations desquels les corpuscules rickettsioïdes pourraient avoir quelque ressemblance morphologique, mais je n'ai pas cru devoir prendre en considération les granulations des éléments sanguins ou d'origine sanguine, car une telle différenciation est élémentaire.

Un travail sur les corpuscules rickettsioïdes a été encore publié par RAPISARDA (17) ; mais les recherches ont été poursuivies avec une technique si déficiente qu'il n'est pas possible d'accorder la moindre valeur aux résultats qu'il obtient.

D'aprés ce qui précède, je pense posséder des éléments suffisants pour affirmer l'existence, dans les tissus trachomateux (épithélium et tissus inflammés sous-jacents) de corpuscules à caractéres morphologiques et tinctoriaux de rickettsias. L'on ne peut considérer comme définis les rapports qui peuvent exister entre ces dits corpuscules et les corpuscules élémentaires des corps de Prowazek ou entre ceux-la et les corpuscules décrits par GREFF dans les nodules trachomateux.

## LES CORPUSCULES RICKETTSIOÏDES ENVISAGÉS COMME AGENTS DU TRACHOME

Les recherches, inédites pour la plupart, que j'ai entreprises en vue d'établir si les corpuscules rickettsioïdes jouent un rôle dans l'étiologie du trachome ne m'ont encore amené à aucun résultat définitif, ni en sens négatif, ni en sens positif. Les autre auteurs qui, eux aussi, se sont efforcés de résoudre ce problème par voie expérimentale, n'ont encore obtenu aucune solution.

Et ici, en introduction, il convient de citer brièvement les inoculations endo-oculaires de matériel trachomateux.

Lorqu'en 1933 je communiquai mes résultats sur les inoculations de matériel trachomateux dans l'oeil, le cerveau et d'autres organes de divers animaux — expériences auxquelles j'avais été amené par mes précédentes études sur le virus herpétique et aprés avoir reconnu à l'agent du trachome certains des caractéres des virus épithéliothropes — une telle orientation expérimentale n'avait encore été tentée par personne. Au cours de mes premiéres expérimentations (BUSACCA 1-c), je n'ai obtenu aucune formation de nodules dans aucun des organes inoculés. VON SZYLI (19) me précéda de quelques semaines dans la publication de résultats sur les quels on fonda tout d'abord beaucoup d'éspoir; il s'agissait de la formation de nodules endo-oculaires, semblables aux nodules trachomateux, en conséquence d'injections dans le corps vitré de matériel trachomateux.

De nombreux auteurs se sont ensuite occupés du sujet et ont pour la plupart conclu, avec VON SZYLI, qu'il s'agissait de formations spécifiques. Pour ma part, insistant dans mes expérimentations et étendant les contrôles, j'en suis venu à conclure que les dits nodules ne sont pas spécifiques, mais représentent une modalité de réaction des tissus endo-oculaires à des stimulants de nature diverse. Cette opinion, en outre de certains autres faits, reçoit pleine confirmation par les expériences récentes de OSADA (12) qui obtient la formation de nodules endo-oculaires en injectant des tissus tonsillaires par la carotide interne.

Il en faut donc retenir que, pour le moment du moins, nous ne pouvons pas accorder de valeur spécifique aux nodules obtenus par inoculations endo-oculaires de matériel trachomateux. Il ne pourra leur être attribué de valeur spécifique que si, une fois le germe identifié, on le peut aussi déceler chez eux.

*

* *

J'ai dit que, pour résoudre la question du rôle que l'on peut attribuer aux corpuscules rickettsioïdes dans l'étiologie du trachome, on avait recouru à l'expérimentation. Dans ce domaine, l'on n'a jusqu'ici eu recours qu'à deux voies: celle de la culture des tissus à la Carrel, et celle de l'inoculation de matériel trachomateux dans les poux.

Culture de tissu trachomateux — POLEFF (15) dit avoir obtenu, avec la méthode de la culture des tissus, des cultures de corpuscules rickettsioïdes, fait qui a été contesté par HARRISON et JULIANELLE (8), par THYGESON (20-c) et par JOHN et HAMBURGER (9). Au cours des assais que j'ai réalisés avec cette technique (1-e), j'ai vu, dans les cultures, des corpuscules mobiles qui, par leur morphologie pouvaient être identifiés avec les corpuscules rickettsioïdes; je n'ai pu toutefois ni établir leur multiplication, ni l'identifíer, dans les cultures fixées.

HARRISON et ses collaborateurs, ainsi que THYGESON non seulement n'ont pas rencontré dans leurs cultures de tissus trachomateux des corpuscules rickettsioïdes, mais encore n'ont pas réussi, avec les dites cultures, à transmettre la maladie aux autres animaux d'expérimentation; d'où ils ont conclu que, tout au moins dans les conditions dans lesquelles les cultures ont été exécutées, l'agent du trachome ne survit pas. Mais ces expérimentations présentent, elles aussi, le même point faible que tous les autres travaux basés sur la transmission du trachome à l'animal, car, ainsi qu'on le sait, nous ne connaissons pas, jusqu'à présent, aucun animal sûrement réceptif et dont les tissus donnent des réactions nettes, constantes et spécifiques.

POLEFF (15-b), en inoculant dans le corps vitré animaux d'expérimentation des cultures de corpuscules rickettsioïdes, a constaté la production d'une uvéite grave avec formation de nodules endo-oculaires; dans ces nodules, il aurait retrouvé les corpuscules rickettsioïdes qu'il aurait de nouveau cultivé en partant des nodules mêmes.

Ces expériences — qui sont basées sur la spécificité des nodules endo-oculaires, dans lesquels toutefois l'auteur aurait trouvé les corpuscules rickettsioïdes qui en seraient l'agent — n'ont pas été reprises jusqu'à présent; il n'y a pas de doute que ce fait est dû, pour une large part, aux difficultés techniques et économiques que présente ce genre d'expérimentation. Les résultats de POLEFF restent donc encore "sub judice" et il ne pourra être question de leur accorder une valeur de solution qu'après qu'ils auront été confirmés.

Dans un travail publié en Avril 1939, POLEFF communique qu'il a réussi non seulement à cultiver — par la méthode de culture des tissus —les corpuscules rickettsioïdes, mais encore à les conserver,

avec passages successifs, pendant près de trois mois. Il a trouvé qu'ils se cultivent fort bien dans le placenta humain, matériel facile à se procurer.

Il a de plus réussi à réaliser une expérience du plus haut intérêt. Il a subdivisé la cornée d'un oeil humain éviscéré en fragments propres à la culture des tissus. Certains d'entre eux furent cultivés comme contrôles, les autres laissés pendant un certain temps en contact avec une émulsion de matériel trachomateux puis, ensuite, cultivés.

Au bout de 10 jours, il trouva, dans les cultures infectées, une grande pullulation de corpuscules rickettsioïdes qui manquaient par contre complètement dans les contrôles. Les passages de ces corpuscules rickettsioïdes sur le placenta se montrèrent positifs.

Je ne sache pas que l'on ait tenté l'inoculation à l'homme de cultures de corpuscules rickettsioïdes.

Inoculations aux poux — Guidés par les études célèbres sur la rickettsia du typhus exanthematique *(Rickettsia prowazeki)* et travaillant dans un Institut spécialisé dans ce type de recherches (je veux dire l'Institut Pasteur de Tunis, alors dirigé par Ch. NICOLLE), CUENOD et NATAF (2-e, f, g, h) ont fait aux poux des inoculations de matériel trachomateux humain, obtenant dans les cellules épithéliales de l'intestin de ces insectes la reproduction des corpuscules rickettsioïdes du trachome. En outre, avec une émulsion de poux ainsi infectés, ils auraient réussi à transmettre la maladie au "Macacus inuus" et à l'homme, retrouvant les corpuscules rickettsioïdes dans les conjonctivites expérimentales ainsi obtenues. Ils ont encore conduit toute une série de recherches avec passages dans le testicule du lapin, dans le pou, dans la conjonctive, inoculant et reprenant le matériel dans diverses conditions d'expérimentation, et ont acquis la conviction que le pou est capable d'être, dans certaines conditions, un dépôt de l'agent du trachome.

Ces recherches, quoique très bien orientées, sans doute, pêchent toutefois, à mon sens, par plusieurs points. Signalons, comme fondamentaux, le nombre restreint des expériences (souvent une seule, et insuffisamment documentée) et l'absence de contrôles adéquats (inoculations a la guenon et à l'homme de poux stériles et d'autres matériaux employés par ces Auteurs), facteurs fondamenteux si l'on veut tirer des conclusions exactes.

Pour ces expériences également, les difficultés d'ordre technique et économique ont fait que, pendant longtemps, elles n'ont pas été reprises par d'autres. Ce n'est qu'au cours de ces derniers mois qu'ont paru des travaux qui n'ont fait qu'augmenter la méfiance que, par

suite de leurs points faibles, inspiraient les résultats de CUENOD et NATAF.

SPARROW (18) au cours d'expériences d'inoculation aux poux de la *Rickettsia prowazeki* a observé que ces insectes présentaient une infection spontanée causée par une rickettsia offrant les caractéres de *Rickettsia rocha-limae*, infection qui s'étendait facilement à tous les élevages. Ces rickettsias ne font preuve d'aucun pouvoir pathogéne sur l'homme.

TRAPESONTZEWA (21), dans une série de recherches sur l'inoculation de matériel trachomateux aux poux, en vient à conclure que, dans les poux inoculés avec ce matérial, on ne rencontre aucune rickettsia. Ce n'etait que si les poux étaient précédemment contaminés par des *Rickettsia rocha-limae* que l'on pouvait, dans certaines conditions d'expérimentation, trouver dans leur intestin une grande quantité des dites rickettsias, qui ne sont toutefois pas pathogènes pour l'homme. En effet, ayant inoculé a la conjonctive humaine une émulsion de poux riche en *Rickettsia rocha-limae*, il n'a observé aucun phénomène pathologique autre que les post-traumatique.

Ces observations ont reçu pleine confirmation par un récent travail de WEIGL (24), qui refuse à la *Rickettsia rocha-limae* toute valeur dans l'étiologie du trachome et taxe d'"erreur grossiére" provenant de l'insuffisance des contrôles, l'hypothèse de CUENOD et NATAF.

Inoculations a la membrane chorion allantoïdienne — Ce genre d'inoculations, tenté pour la première fois par PANDIT et ses collaborateurs (14) et qui avait donné des résultats incertains tant à ces auteurs qu'a d'autres, a été, au cours de cette année, répété par CUENOD et NATAF; ceux-ci aureient rencontré les corpuscules rickettsioïdes tant dans les oeufs inoculés directement avec du tissus trachomateux que dans les passages en série.

Recherches serologiques — On a tenté, récemment, de résoudre par voie indirecte la question de savoir si l'agent du trachome appartient à la famille des rickettsias, et, prenant toujours comme point de départ les études sur le typhus exantématique, on a essayé le pouvoir agglutinant du sérum des trachomateux sur le Proteus X-19.

Les quelques recherches effectuées dans cette direction sont déjà en contradiction; alors que certains auteurs avaient obtenu des résultats positifs (DERKAC (3) ; DJOURICHITCH et LOUKITCH (4) ; POLEFF (15-c) ; POSTIC (16) et pensent, par conséquent, que l'agglutination peut avoir une valeur probante pour différencier le trachome des autres affections, d'autres ont eu des résultats négatifs (DOURAND et LOM-

BROSO) (5), ou douteux (NOURY) (10) ; ils expliquent les résultats positifs des premiers auteurs en admettant la présence, dans la région, du typhus exanthématique ou de personnes vaccinées contre celui-ci.

Signalons ici l'opinion de WEIGL — compétence incontestable sur le sujet des rickettsias — exprimée dans un récent travail (24) dans lequel il examine la question sur la base de ses données propres et de celles d'autres Auteurs.

Aprés avoir écarté — comme je l'ai déjà dit plus haut — l'hypothèse de l'identité entre l'agent du trachome et la *Rickettsia rocha-limae* il examine, à un point de vue général, la question de la valeur de la réaction de Weil-Felix. Il fait remarquer que cette réaction n'est pas une réaction entre un antigène et un anticorps spécifique mais qu'elle est déterminée par des agglutinines aspécifiques. Ces agglutinines ne possèdent pas non plus une spécificité de groupe, en ceci qu'on ne les rencontre pas dans toutes les rickettsioses; c'est ainsi qu'elles manquent, par exemple, dans une rickettsiose typique: la fiévre quintane.

En conséquence, la valeur d'une réaction de Weil-Felix positive avec du sérum de trachomateux est nulle si l'on prétend s'en servir pour établir que le germe du trachome appartient à la famille des rickettsias.

WEIGL fait remarquer que, si l'on observe du point de vue morphologique les éléments des corps de Prowazek, l'analogie avec les rickettsias est "frappante". Mais pour lui, la seule morphologie ne suffit pas à définir ce groupe encore mal délimité. Il manque à ces corpuscules du trachome un caractére fondamental pour que l'on puisse les ranger parmi les rickettsias: celui de la multiplication dans les cellules des arthropodes.

*
* *

En conclusion, devant l'ensemble des études citées plus haut, je pense pouvoir affirmer que, tandis que l'on doit admettre la présence de corpuscules rickettsioïdes dans les tissus trachomateux, se basant sur les recherches faites par les méthodes morphologiques, l'on n'a par contre pas encore bien établi la part que l'on peut leur attribuer dans l'étiologie du trachome. Les recherches expérimentales faites jusqu'a présent avec diverses méthodes n'ont pas abouti à des résultats nettement positifs; il ne faut pas en conclure toutefois que cette nouvelle orientation ait déjá achevé son cycle. De nouvelles études et de nouvelles expériences s'imposent avant de pouvoir accepter ou rejeter les conclusions auxquelles certains chercheurs sont arrivés.

Je pense aussi que c'est à moi que revient intégralement la priorité de cette nouvelle orientation dans les études sur l'étiologie du

trachome, et je note ce fait parceque, si certains auteurs ont expressément reconnu cette priorité, d'autres, au contraire, ont récemment tenté de la contester.

BIBLIOGRAPHIE

1) BUSACCA: a) *Sulla presenza di germi simili a rickettsie nei tessuti tracomatosi.* XIV Congr. Intern. Oftalm. Madrid. 1933 e Folia Clinica et Biolog. 1933. N. 1-2. — b) *Ueber das Vorhandensein von Rickettsien-aehnlichen Koerperchen in den trachomatoesen Geweben, und ueber das Vorkommen von spezifischen Veraenderungen in Organen von mit Trachom-Virus geimpften Tieren.* Graefe's Arch., f. Ophth. Bd. 133. 1934. — c) *Nouveaux résultats en pathologie éxperimentale du trachome,* Folia Clin. et Biolog. 1935. N. 2 e Compts. R. Soc. Biol. 1936. — d) *Les nodules obtenus aprés inoculation intravitréenne de matériel trachomateux sont-ils specifiques?* Ann. Oculist. 1936. N. 7. — e) *Observations sur la culture de tissus trachomateux par la methode de Carrel, etc.* Arch. d'Ophth. 1938. N. 2.

2) CUENOD: a) *Note préliminaire sur la présence d'élements infra-microbiens dans les follicules trachomateux.* Arch. d'Ophth. 1935. b) — e NATAF: *Deuxièmme note sur la présence d'élements infra-microbiens dans les follicules trachomateux.* Arch. d'Ophth. 1935. — c) *Sur la présence d'élements rickettsioïdes abondants et trés constants dans les follicules trachomateux.* Rev. Intern. Trach. 1935. — d) *Troisiémme note sur l'agent bactérienne du trachome.* Arch. d'Ophth. 1936. — e) *Nouvelles recherches sur le trachome. IV note: recherches expérimentales.* Arch. D'Ophth. 1936. — f) *Recherches expérimentales sur la contagiosité du trachome.* Rev. Intern. Trach. 1937. — g) *Recherches sur l'étiologie et la pathogenie du trachome.* Rev. Intern. Trach. 1937. — h) *Du polymorphisme des rickettsias.* Arch. Inst. Pasteur Tunis. 1937. i) *Nouvelles recherches expérimentales dans le trachome.* Annal. Oculist. 1937 — 1) *Nouvelles recherches sur le virus trachomateux.* Arch. Inst. Pasteur Tunis. 1938.

3) DERKAC: *Zur Aetiologie des Trachoms.* Klin. Mon. f. Augenh. 1937. Bd. 99.

4) DJOURICHITCH e LOUKITCH: *Examen de la séroréaction de Weil-Felix chez les malades trachomateux.* C. R. Soc. Biol. 1938.

5) DOURAND e LOMBROSO: *Trachome et agglutination des proteus.* Arch. Inst. Pasteur Tunis. 1938.

6) FOLEY et PARROT: a) *Sur la rickettsia du trachome.* C. R. Soc. Biol. 1937. — b) *Rickettsia du Trachome.* Arch. Inst. Pasteur Algerie 1937. — c) *Sur les formes d'évolution de Rickettsia Trachomatis.* Arch. Inst. Pasteur Algerie 1938. — d) *A propos de la rickettsia du trachome.* Arch. d'Ophth. 1939.

7) GRUETER: *Die Mikrostruktur der Epithelzelle und ihre Bedeutung für die Aetiologie des Trachoms.* Rev. Intern. Trach. 1938.

8) HARRISON e JULIANELLE: *Studies on the infectivity of trachoma. VI. Cultivability of the infectious agent in tissue cultures.* Amer. Journ. Ophthalm. 1937.

9) JOHN e HAMBURGER: *Ergebnisse von Züchtungsversuchen des Trachom und Paratrachomvirus.* — Graefe's Arch. f. Opht. 1938. Bd. 138.

10) NOURY: *Trachom e Proteus, etc.* C. R. Soc. Biol. 1938.
11) OISHI: *Ueber die Einschlussconjunctivitis und das Trachom, etc.* Acta Soc. Ophth. Jap. 1938. Ref. Z. Opht. Bd. 42.
12) OSADA: *Einspritzungsversuche mit Emulsionen von menschlichem hypertrophiertem Tonsillengewebe in die Blutbahn des Kaninchens.* Acta Soc. Ophth. Jap. 1938. Ref. Z. Opht.
13) PAGES: in NATAF: *Rickettsia et Trachome.* Algerie Medicale 1937.
14) PANDIT, WRIGT, SANJIVA RAO e SATYANATHAN: *Preliminary note on the investigation of trachoma by the technique of culture on the chorio-allantoid membrane of the embryo chick.* Indian J. Med. Res. 1935. Ref. in Z. Opht. Bd. 36.
15) POLEFF: a) *Transmission aux animaux et culture cellulaire du trachome.* Rev. Intern. Trach. 1936. — b) *Culture des rickettsias du trachome in vitro.* Arch. d'Ophth. 1936. — c) *Culture de pannus trachomateux avec presence de rickettsias. Presse Medic.* 1937. — d) *Die Gewebekultur im Dienste der aetiologischen Trachomforschung.* Arch. Exper. Zellfors. 1937. Ref. Z. Opht. Bd. 39. — e) *Seroreaktion von Weil-Felix bei Trachom.* Klin. Mon. f. Augenh. 1938. Bd. 101. — f) *Passage des corpuscules rickettsioïdes du trachome sur les tissus de l'oeil humain hors de l'organisme, etc.* Rev. Intern. Trach. 1939.
16) POSTIC: *Bemerkungen zu dem Vortrag* CUENOD *und* NATAF. XV Congr. Intern. Ophth. Cairo 1937 — Klin. Mon. f. Augenh. 1939, Bd. 102. — Rev. Intern. Trach. 1939.
17) RAPISARDA: *Ricerche batteriologiche sulla presenza di corpi inframicrobici nel tracoma.* Rass. Ital. Oftalm. 1937.
18) SPARROW: *Infection spontanée des poux d'élevage par une rickettsia du type Rocha Limae.* Bull. Soc. Pathol. Exot. 1939.
19) VON SZILY: *Uebertragungsversuche mit Trachommaterial.* Klin. Mon. f. Augenh. 1935. Bd. 94 e 95.
20) THYGESON: a) *The nature of elementary and initial bodies of trachoma.* Arch. of Ophth. 1934. Vol. 12. — b) *Problem of rickettsias in trachoma.* Arch. of Ophth. 1938. Vol. 20.-c) *Cultivation of trachomatous conjunctival epithelium in vitro.* Arch. of Ophth. 1939. Vol. 21.
21) TRAPESONTZEWA: *A propos des Rickettsias du trachome.* Rev. Intern. Trach. 1939.
22) CIOTOLA: *La reazione di Weil-Felix nel tracoma.* Boll. Ocul. 1939.
23) MANDITCH: *La valeur diagnostique de la réaction de Weil-Felix dans le trachome.* Rev. Intern. Trach. 1939.
24) WEIGL: *Trachomstudium. I. Rickettsia Rocha-limae* (WEIGL) *ist nicht der Trachomerreger.* Zentralbl. Bakter. Paras. und Infek. Orig. Bd. 143. 1939.
25) BRALEY: *The rickettsia question in the trachoma*: I. *Microscopic observations on the virus.* — Arch. of Ophth. 1939. Vol. 21. N. 5.

S. Paulo, juin 1939.

— —o— —

# SOBRE UM PARASITO SEMELHANTE AO "RHINOSPORIDIUM", ENCONTRADO EM QUISTOS DA PELE DE UMA "HYLA"

PELO

Dr. A. Carini

Do Laboratorio Paulista de Biologia, S. Paulo

Com as estampas 30-31

No começo de Outubro de 1939 recebemos de Tieté (Est. de S. Paulo), um lote de oito "Hylas" vivas, todas da especie *Hyla rubra*.

Em uma delas notamos a presença, na pele do abdomem, de dois diminutos nódulos do tamanho da cabeça de um alfinete (cerca de 1 mm. de diametro). A pele não apresentava alterações, só aparecia ligeiramente levantada, como se houvesse no tecido subcutaneo um pequeno cisto.

Verificamos então melhor se lesão semelhante se encontrava nas outras "Hylas", e achamos de fato uma que apresentava, tambem na pele do abdomem, um unico, pequeno nódulo, perfeitamente identico aos outros.

Suspeitamos a principio que se pudesse tratar de alguma larva de verme aí enquistada e não ligamos excessiva importancia ao nosso achado. Entretanto, no desejo de procurar esclarecer a verdadeira naturesa da lesão, retiramos com a tesoura os tres pequenos nódulos, cada um com um pouco da pele visinha, fixamo-los em Bouin, incluimos em parafina.

O exame microscopico dos cortes mostrou que se trata de interessante parasita, talvez até agora não descrito.

Os cortes praticados interessando os pequenos nódulos mostram que estes são constituidos por quistos arredondados ou ovalares, situados na derma, logo debaixo da camada epitelial; os quistos são limitados por uma capsula que parece formada por duas finas camadas, sendo a externa conjuntiva e irregular, devida á reação do tecido, a outra, interna, propria ao parasita, de aspeto anista e de cerca de 3 a 4 microns de espessura. Os quistos maduros medem 400 a 500 μ (sendo pois um pouco maiores que os do *Rhinosporidium* que medem só 200 — 250 microns) e estão cheios de grande numero de espóros redondos ou ligeiramente ovaes, medindo de 8 a 10 microns de diametro. Cada esporo tem uma membrana e um protoplasma no qual, com a hematoxilina ferrica, se vêem varias granulações pretas de tamanhos diferentes.

A' medida que aumentam de volume, os quistos exercem, com a sua turgecencia, certa pressão sobre a camada do epitelio cutaneo, que fica levantado e se torna cada vez mais adelgaçado até desgastar-se; a parede do quisto abre-se então no mesmo ponto e os esporos ficam assim livres na superficie cutanea da *Hyla*.

Nas nossas preparações, conseguimos ver só os quistos, mais ou menos maduros, faltando outras formas de desenvolvimento do parasita. Esperamos, porém, encontrar outras "Hylas" com as mesmas lesões, para tentar infecções experimentais e estudar o ciclo evolutivo. Parece que a infecção natural é muito rara, pois nestes ultimos anos temos examinado centenas de "Hylas" desta especie, sem que a nossa atenção tivesse sido detida por semelhantes lesões da pele.

Da mesma localidade de Tieté já recebemos dois outros lotes de "Hylas", mas nenhuma continha quistos visiveis da pele.

Tambem nos cortes histologicos da pele do abdomem destas "Hylas" não encontramos parasitas.

Quem confrontar as fotografias dos nossos preparados, aqui reproduzidas, com as de *Rhinosporidium*, notará logo a grande semelhança, tanto dos quistos como dos esporos. Parece-nos que podemos colocar o parasita por nós encontrado, no mesmo grupo.

Entretanto, tendo em consideração a grande distancia na escala zoologica, dos animais hospedeiros, a diferença de tamanho dos quistos e a sua localisação cutanea, julgamos conveniente, até melhores verificações, colocar o parasito em novo genero, para o qual propomos o nome de *Dermosporidium*, n. g.

Chamaremos pois o parasito de *Dermosporidium hylarum*, n. g. n. sp.

ADDENDUM

Depois de redigida e entregue á redação a nota acima, recebemos da mesma localidade varios outros lótes de "Hylas", mas só uma *Hyla*, chegada em fim de Novembro de 1939, apresentava, na péle do abdomen, dois quistos, iguais aos que acabavamos de descrever.

Com a ponta de uma agulha abrimos os dois quistos, dando saída á uma substancia branca, móle, que examinada ao microscopio mostrou-se constituida por espóros.

O material retirado de um quisto foi utilisado para inoculações experimentais em cinco "Hylas" da mesma especie. Uma foi inoculada debaixo da péle, uma outra por via intradérmica, numa terceira praticaram-se varias escarificações superficiais na péle do abdomen, sendo aí depositada uma gota de material rico de espóros.

Duas outras "Hylas" receberam numerosos espóros por via bucal.

Todos os animais, assim inoculados, foram conservados, sem alimentação, em ambiente humido (dentro de vidros de boca larga, nos quais se deixára um pouco de agua, que era trocada todos os dias) e observados até sobrevir a morte; as "Hylas" geralmente resistiam algumas semanas. Os resultados foram todos negativos. De todas as "Hylas" foram examinadas os orgãos e a pele, sem nada se encontrar.

O conteúdo do segundo quisto, que também encerrava numerósos espóros, serviu para tentativas culturais: em gota pendente, em gelóse e caldo Sabouraud; mas os resultados foram tambem negativos, não se tendo notado nenhum desenvolvimento; os espóros mantiveram-se durante muito tempo inalterados.

Voltando á *Hyla* que forneceu o material para as inoculações, devemos acrescentar que, uma vez esvasiados os quistos, as duas pequenas feridas da péle cicatrizaram rapidamente e, após alguns dias, notavam-se só duas manchas de côr ligeiramente escura, em via de desaparecimento.

Procurando na literatura, encontramos noticias de achados semelhantes ao nosso, havendo diversos observadores descrito, na péle de anuros e batraquios, assim como nas guelras de alguns peixes, pequenos quistos, cheios de espóros, tendo sido estes parasitas classificados no genero *Dermocystidium*.

Os *Dermocystidium*, até agora conhecidos, são os seguintes: *D. pusula* PEREZ, 1907, encontrado na pele do *Triton marmoratus*. Fórma: pequenos quistos esféricos de 1 mm. de diametro, cheios de espóros redondos de 8-10 μ. O mesmo parasita foi observado por MORAL (1913) no *Triton cristatus* e por GAMBIER nos *Triton palmatus* e *T. alpestris*.

*D. branchialis* LEGER, 1914, que vive nas guelras das trutas, *Salmo trutta* L.

Os quistos maduros medem até 1,2 mm. e os espóros 7-8 μ.

*D. ranae* GUYENOT e NAVILLE, 1922, encontrado no tecido subcutaneo da *Rana temporaria* e depois, em 1931, por REMY, na *Rana esculenta;* os pequenos quistos não são globósos, mas apresentam a fórma de um tubo curvado em *U*, que traz em cada extremidade um botão.

*D. daphniae* RUHBERG, 1933, descrito como uma infecção devida a levedos na *Daphnia magna*.

*D. vejdovskyi* JIROVEC, 1939, achado nas guelras do peixe lucio *(Eson lucius)*.

E' fóra de duvida que os quistos por mim encontrados na *Hyla rubra* apresentam certa semelhança com os causados por *Dermocystidium*. Mas considera-se carateristica dos espóros do genero *Dermocystidium* a presença de uma inclusão redonda fortemente refrangente com camadas concentricas. O nucleo é empurrado para a periferia e o protoplasma é reduzido á uma faixa semilunar.

Nada de semelhante foi visto nos espóros do nosso parasita. A estrutura destes espóros é bem diferente, assemelhando-se muito á dos espóros do *Rhinosporidium*. Além disso, os quistos do nosso parasita diférem dos encontrados na péle das rãs da Europa porque nestas os quistos, em lugar de esféricos, são, como dissémos, em fórma de tubo.

Por todas essas razões julgamo-nos autorisádos a colocar, pelo menos provisóriamente, o nosso parasita em novo genero *Dermosporidium*.

Não tendo conseguido culturas nem encontrado as fáses iniciais evolutivas do parasita, nada podemos adiantar a respeito de sua posição sistemática. Parece porém certo que o *Dermosporidium* apresenta estreitas afinidades com *Rhinosporidium* e *Dermocystidium*.

E' sabido que a posição sistemática destes parasitas é ainda muito discutida. Modernos micólogos, como CIFERRI, classificam-nos entre os cogumélos, ao lado dos agentes causadores dos granulomas cocidióide e paracocidióide, (blastomicóses) o que torna ainda mais interessante o estudo de taes parasitas.

## BIBLIOGRAFIA

CIFERRI, R. — 1932 — Sulla posizione sistematica del generi Coccidioides e di due generi affini. *Arch. für Protistenkunde*, 78, 2.

DUNKERLY, J. S. — 1914 — Dermocystidium pusula Perez, parasitic in Trutta fario. *Zool. Anz.*, 44, 179.

GUYENOT, E. et A. NAVILLE — 1922 — Un nouveau protiste du genre Dermocystidium parasite de la Grenouille. *Rèvue Suisse de Zool.*, 29, 133.

JIROVEC, OTTO — 1939 — Dermocystidium vejdovskyi n. sp. ein neuer Parasit des Hechtes. *Arch. für Protistenkunde*, 92, 137-146.

LAGER, L. — 1914 — Sur un nouveau Protiste du genere Dermocystidium parasite de la truite. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 158, 807.

PEREZ, C. — 1913 — Dermocystidium pusula, parasita de la peau des Tritons. *Arch. Zool. Gen. et Esp.*, 52, 343.

REMY, P. — 1931 — Présence de Dermocystidium ranae (Guyenot et Naville) chez une Rana esculenta L. de Lorraine. *Annales de Parasitol*, 9, 1.

———o———

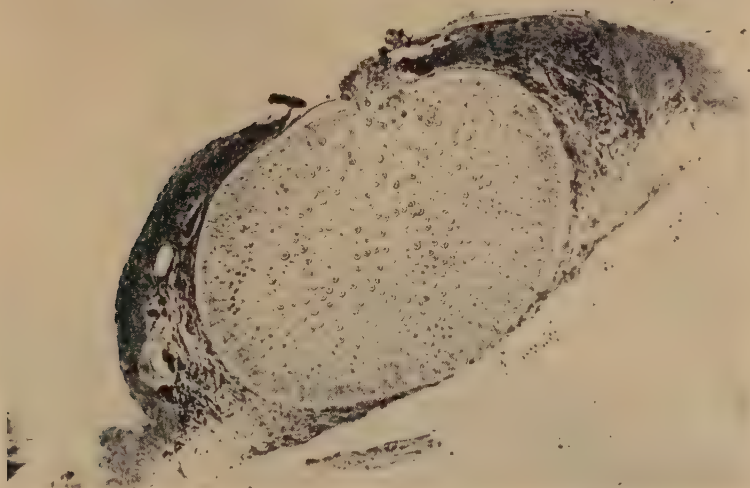


Fig. *A* — Quisto debaixo da pele - A camada epitelial e a parede do quisto estão rompidas e os esporos sáem á superficie da pele. Pequeno aumento. Col. Hematoxilina eosina

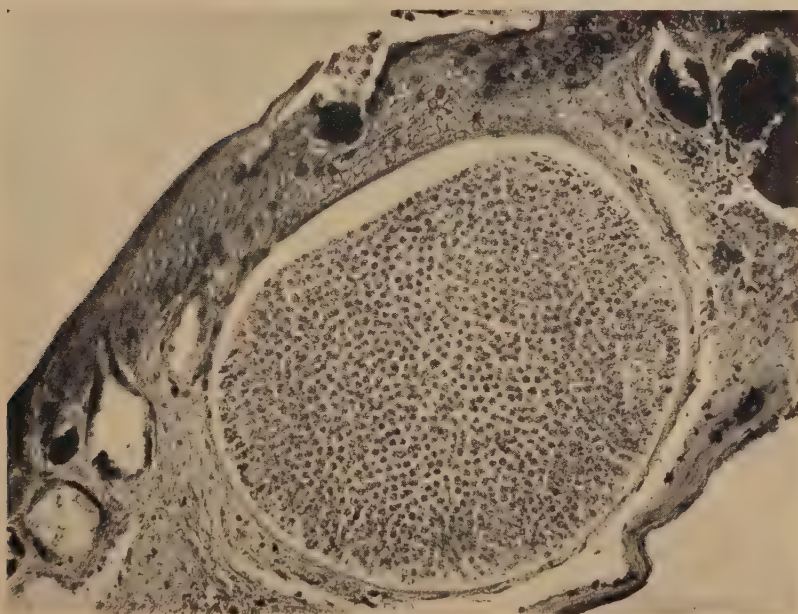


Fig. *B* — Outro quisto - Aumento maior. Col. Hematoxilina ferrica

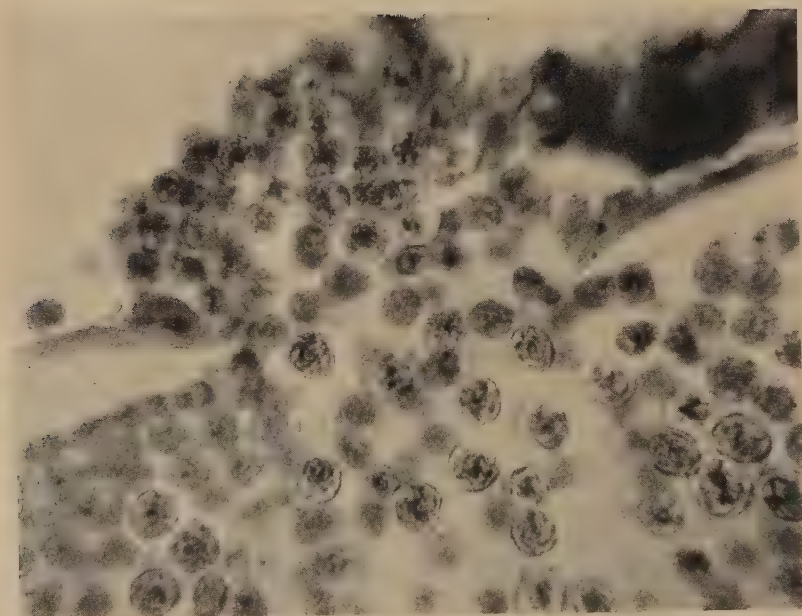


Fig. *C* — Os esporos vistos com objetiva de imersão

# A COBAIA NO ESTUDO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE AUJESZKY

POR

## V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Constitue velha noção, registrada pelos tratadistas, datando mesmo da descoberta do virus, a que se refere à grande sensibilidade do coelho à doença de Aujeszky. Ela decorre mesmo dos estudos iniciais do próprio AUJESZKY e aparece confirmada por SCHMIEDÖFFER (8), por ZWICK e ZELLER (2-12), os primeiros entre os que se ocuparam do estudo da infecção experimental, no decênio que se seguiu à descoberta da doença.

As pesquizas realizadas de 1930 para cá, quando esses estudos foram retomados como problema de atualidade, depois de um longo periodo de esquecimento, confirmaram sempre, com dados novos e numerosos, a idéa inicial de que o coelho é o animal mais sensivel e o mais indicado para o trabalho experimental. O estudo da infecção no laboratório, realizada por vias de inoculação as mais variadas e numerosas, a pesquiza da virulência das diluições, realizada com numerosas amostras de várias procedências, principalmente por via cerebral e por via subcutanea, a comparação desta espécie com as outras espécies inoculaveis com resultado, — puseram sempre em relevo, sem alterá-la de um modo geral, a noção da grande sensibilidade do coelho. REMLINGER e BAILLY (5-6), que fazem, recentemente, completa revisão do quadro clínico da infecção experimental do coelho, descrevem mesmo, só pelo emprego da via cerebral, cinco formas clínicas, o que testemunha a rica sintomatologia que a doença apresenta nesta espécie.

O coelho ficou assim, sem dúvida, como o animal eletivo para o isolamento do virus, passagens em série para a conservação das amostras isoladas, e de um modo geral, para todo o estudo experimental. E' insubstituivel na rotina de um laboratório que se ocupe da doença.

A cobaia ficou, no caso, em situação secundária, fornecendo resultados inconstantes e menos seguros. REMLINGER e BAILLY, em inoculações realisadas no coelho e na cobaia, simultaneamente, têm, por exemplo, o seguinte resultado, sem indicação da via utilisada, o que faz supôr o uso de várias vias de inoculação: em 28 experiências, o resultado é positivo 16 veses nas duas espécies e 12 veses positivo no coelho e negativo na cobaia. Nenhuma vês o resultado é positivo na cobaia e negativo no coelho.

Mas certos aspétos novos desta questão foram estudados de modo especial e em detalhe. Assim, foi melhor determinada, por comparação, a diferença de sensibilidade das duas espécies, e além disso foi investigada de modo particular a ação exercida sôbre o virus pelas passagens em série pelo cérebro da cobaia.

SHOPE (10), em um trabalho consagrado apenas a êste assunto, estuda as modificações sofridas pelo virus nas passagens pelo cérebro da cobaia e verifica três ordens de fatos interessantes:

1 — Ha, antes de tudo, um empobrecimento do cérebro da cobaia em unidades virulentas, quando comparado com o cérebro do coelho; êste contém dez vezes mais virus que aquele.

2 — Ao lado desta noção, verifica-se que ha de fato uma menor sensibilidade da cobaia, expressa pela indicação de que por via subcutanea ela é 100 veses mais resistente que o coelho.

3 — Finalmente, póde-se observar que existe uma verdadeira atenuação do virus em sua passagem pelo cérebro da cobaia, verificavel nas inoculações por via subcutanea. Basta uma única passagem pela cobaia para que esta diferença apareça.

Como se vê, a questão da menor sensibilidade da cobaia não depende apenas de um único fator, mas está ligada à associação de três fatores: menos número de unidades virulentas no seu cérebro, menor resistência de espécie e diminuição da virulência do virus, — fatores que agem na mesma direção, e dissociados nas experiências de SHOPE.

E' desnecessário ressaltar a importância dêsses ensaios, que explicam as largas diferenças de sensibilidade das duas espécies e restringem sobremodo o uso da cobaia no estudo da doença de Aujeszky.

GERLACH e SCHWEINBURG (3-4) confirmam amplamente os resultados acima, relativos à ação das passagens do virus pelo cérebro da cobaia, vendo cair o índice de DLM.

## I — AS INDICAÇÕES DO USO DA COBAIA

Mas si o coelho conserva o seu logar como animal insubstituivel, a cobaia, apesar das verificações contrárias ao seu emprego generalisado, tem hoje, sem dúvida, em casos especiais, como veremos, uma grande utilidade e mesmo um logar bem fixado na rotina do laboratório que se ocupa da doença de Aujeszky. A tendência do experimentador é sempre, à primeira vista, a de considerar indicado realisar-se toda a série de experiências na espécie mais sensivel, e nem sempre reside aí a possibilidade de resultados satisfatórios. Pelo contrário, ha casos em que a cobaia é preferivel e mesmo insubstituivel no estudo do virus. Julgamos, por isso mesmo, que é importante fixar as regras do seu uso no estudo da doença de Aujeszky, não sendo os resul-

tados no coelho paralelos. Faremos uma revisão da infecção experimental nesta espécie. Examinaremos ainda as diferenças de sensibilidade dentro da mesma espécie, condicionadas pela via de inoculação utilisada e pela amostra de virus. Acentuaremos especialmente o grande interêsse da via intramuscular, como via sevéra de infecção em certos trabalhos de rotina, que decorre de nossos ensaios com amostras de virus aqui isoladas, indicando a DLM pelo emprego desta via.

A contra-indicação formal ao uso da cobaia reside na necessidade de não se realisarem nesta espécie passagens em série, mas apenas inoculações primeiras, de material procedente de coelho ou de outras espécies sensiveis.

As indicações que podem ser fixadas para o uso da cobaia persistem e se verificam em dois ou três casos:

1 — No diagnóstico da doença, quando póde ser empregada isoladamente, mas deve sê-lo de preferência ao lado do coelho.

2 — No preparo de sôros neutralisantes do virus, que são obtidos no porco e na cobaia.

3 — Mas, sobretudo, na pesquisa de anticorpos neutralisantes do virus em sôros de várias espécies, como no sôro de suinos e da própria cobaia, pesquisas que datam dos primeiros ensaios de Shope (8-10) e que no nosso meio, realisamos de modo satisfatório, conforme relatámos em trabalho anterior (1).

O uso da cobaia, neste último caso, mostra sua superioridade sôbre o coelho, uma vês que não é indiferente, usando as mesmas doses de virus e de sôro, inocular qualquer das duas espécies. Alguns autores europeus usaram o coelho em ensaios dêste gênero. Tivemos de inicio alguns resultados igualmente favoraveis nesta espécie. Mas nem sempre isso se verifica. As experiências em série, de Shope (11), foram conduzidas na cobaia e dos ensaios dêste autor e dos de Sabin (7) conclúe-se que os resultados não são sempre paralelos.

Um sôro que, inoculado no coelho, em presença de determinada dose de virus, se mostra destituido de poder neutralisante do virus, póde revelar um poder neutralisante nítido e mesmo elevado quando uma mistura identica é inoculada na cobaia. Nas nossas experiências em série tivemos ocasião de verificar, numerosas veses, essas diferenças de resultados, trabalhando com numerosas amostras de sôros de porcos, de várias procedências, que a julgar apenas pelos primeiros resultados no coelho deveriam ser consideradas desprovidas de anticorpos neutralisantes; quando porém os ensaios foram feitos na cobaia todos êsses sôros, cerca de 20 amostras diversas, revelaram poder neutralisante nítido e elevado, de modo que 100 mgr. de virus, correspondendo a cerca de 250 DLM para a cobaia, eram neutralisadas por 1 cc. — 0.5

e mesmo 0.1 cc. de sôro, em experiências em que as cobaias inoculadas com as misturas de contrôle, feitas com sôros normais, tinham sintomas típicos e morriam ao cabo de 2-3 dias.

E' importante chamar a atenção para esta diferença de resultados, que com numerosos sôros examinados se mostrou como um fenomeno constante, pois o seu desconhecimento levaria a considerar como sôros não neutralisantes amostras de sôros de porcos que em realidade, neutralisam o virus. Nossos ensaios numerosos, em que esta diferença de resultados no coelho e na cobaia se verificou, foram feitos com sôros de porcos que passaram por uma infecção natural. Os ensaios de SABIN referem-se a um único sôro obtido em condições experimentais por SHOPE. Esta diferença de comportamento das misturas virus-sôros, condicionada pela espécie animal de experiência, é dada pelo que SABIN (7) chama um corolário do fenomeno de ANDREWS e TODD. E' claro que nos estamos referindo a experiências conduzidas com quantidades identicas de virus e sôro, em inoculações feitas paralelamente no coelho e na cobaia. Analisaremos oportunamente, de modo especial, esta questão. Parece no entanto indicado desde já tornar claro que neste gênero de experiências, de inoculações de misturas virus-sôro, — a cobaia é o animal de escolha para pesquisa de anticorpos.

## II — A VIA DE INOCULAÇÃO

A primeira indicação a ser considerada no emprego da cobaia refere-se à escolha da via de inoculação. O uso da via subcutanea, mesmo com material rico em virus, feito de emulsão de cérebro de coelhos em diluições a 1. p. 10 — 1 p. 20, — oferece-nos com frequência resultados negativos. A julgar pelos numerosos ensaios que realisámos, é impossivel conseguir organisar qualquer rotina para este gênero de experiências usando a via subcutanea e trabalhando com amostras brasileiras de virus. E' inutil insistir neste ponto, sôbre o qual alguns dados vão adiante referidos. Basta esclarecer que devem ser recebidas com reservas experiências em que a via subcutanea é empregada na cobaia, sobretudo quando se trata de procurar presença de virus no sangue, ou em organs, ou de um modo geral, em material cuja virulência deve ser baixa ou inconstante. Um segundo inconveniente desta via seria o que resulta da inconstancia do prurido local, nos animais que sucumbem à inoculação, pelo que se tornam necessárias incomodas passagens de contrôle, para determinação da *causa mortis*.

A sensibilidade da cobaia por via subcutanea parece variar sob a dependencia do fator amostra de virus. A amostra clássica Aujeszky, procedente da Ungria, assinala SHOPE (11), tem virulência ligeiramente maior e mais constante para a cobaia por via subcutanea. A ob-

servação acima nasceu do confronto desta última amostra com a isolada nos Estados Unidos, denominada amostra Iowa. Nos nossos ensaios as amostras brasileiras parecem fornecer ainda com maior frequência resultados negativos por via subcutanea. O quadro da tabela 1 é um ensaio típico, entre outros nesse sentido. De seis cobaias inoculadas, duas por via cerebral, duas por via intramuscular e duas por via subcutanea, só as duas últimas fornecem resultados negativos.

TABÉLA 1

Resultado das inoculações do virus de Aujeszky por diversas vias, na cobaia

| Animal | Via | Dose | Data | Resultado |
|---|---|---|---|---|
| Cobaia | | | | |
| 12.867 | cerebral | 0.15 | 27-1-37 | + 30-1-37 Passagem positiva |
| 68 | » | 0.15 | » | + » » » |
| 69 | s. cut. | 1.0 | » | — |
| 70 | » | 0.5 | » | — |
| 71 | muscular | 0.5 | » | + 2-2-37 Prurido local |
| 72 | » | 1.0 | » | + » » » |

Material usado: Virus Laranjal; medula lombar de uma vaca, de um caso de infecção natural. Emulsão espessa de substância nervosa.

No início dos nossos ensaios relativos à pesquiza de anticorpos protetores em sôros de porcos, trabalhando com outra amostra de virus, a amostra isolada de um caso ocorrido em Jardinopolis, com frequência falharam as primeiras tentativas na cobaia, por via subcutanea, mesmo quando se tratava de inoculações de misturas de contrôle, constituidas de virus e sôros de porcos normais. Tivemos que renunciar ao emprego desta técnica. Em ensaios do mesmo gênero SHOPE servia-se de via subcutanea, mas da amostra de virus denominada Aujeszky.

## III — A DLM DO VIRUS DE AUJESZKY POR VIA INTRAMUSCULAR NA COBAIA

As indicações preliminares da tabéla 1, confirmadas por outros ensaios, levaram-nos a estudar de perto a possibilidade do emprego desta via de inoculação e a examinar a sua DLM. O resultado consta da tabéla 2 e aí se vê que as diluições altas ainda fornecem regularmente resultados positivos. Estas experiências foram feitas com a amostra Jardinopolis, que em ensaios no coelho, por via subcutanea, tem a sua DLM determinada como sendo 1 cc. de uma emulsão a 1 p. 5.000, correspondendo a 0.0002 gr.

Os resultados da tabéla 2 mostram que o virus pode ainda ser regularmente infectante, determinando a morte, até a uma diluição a 1 p. 10.240, em experiência com uma amostra de 32 passagens pelo cérebro do coelho. Estes ensaios foram repetidos com resultados mais ou menos concordes. Assim, em uma segunda série de inoculações, em 8 cobaias, com diluições de 1 p. 40 a 1 p. 5.120, sete fornecem resultados positivos, tendo falhado apenas a cobaia inoculada com a diluição de 1 p. 1.280. Outras inoculações mostraram que a partir de 1 p. 5.120 o resultado passa a ser inconstante. Tomamos, pois, a DLM como sendo aproximadamente a que é dada por 1 cc. de uma emulsão a p. 2.500, considerando assim que 1 cc. de uma emulsão a 1 p. 10 contendo 100 mgr. de cérebro de coelho, possue cerca de 250 DLM para a cobaia por via intramuscular.

TABÉLA 2

Determinação da DLM do virus da doença de Aujeszky, por via intramuscular na cobaia

| Animais inoculados | Dose | Diluição | Via | Resultado |
|---|---|---|---|---|
| Cobaia 12206 | 1 cc. | 1 p. 20.480 | Muscular | — |
| 7 | » | 1 p. 10.240 | » | + |
| 8 | » | 1 p. 5.120 | » | + |
| 9 | » | 1 p. 2.560 | » | + |
| 10 | » | 1 p. 1.280 | » | + |
| 11 | » | 1 p. 640 | » | + |
| 12 | » | 1 p. 320 | » | + |
| 13 | » | 1 p. 160 | » | + |
| 14 | » | 1 p. 80 | » | + |
| 15 | » | 1 p. 40 | » | + |
| 16 | » | 1 p. 20 | » | + |
| 17 | » | 1 p. 10 | » | + |

Ensaios feitos com a amostra Jardinopolis da nossa coleção de virus, de 32.ª passagem.

As inoculações de experiências em série por esta via oferecem ainda uma vantagem, além da que é dada pela severidade e regularidade das inoculações: a constância da lesão local dada pelo prurido, ou de fenomenos locais de reação, é impressionante nas séries de cobaias inoculadas, o que facilita a leitura dos resultados de experiências, sem o recurso das passagens.

Numerosas inoculações confirmaram depois dos primeiros ensaios, as vantagens da via intramuscular na técnica de rotina visando a pesquiza de anticorpos neutralisantes do virus em sôros de porcos. Em 37 cobaias inoculadas por essa via, com misturas virus-sôro de porcos normais, funcionando como controles nas diversas séries de experiências para pesquiza e dosagem do poder neutralisante de sôros, tivemos 37 resultados positivos, com a presença do prurido local dando lesão caracteristica, em quasi todos esses animais inoculados, ou dando pelo menos fenômenos locais de reação especificos, o que documenta de modo demonstrativo a regularidade das infecções, a severidade da via de inoculação e as suas reais vantagens nas experiências dêste gênero. Além disso, o periodo de incubação é regularmente curto, de cerca de 48 horas, como veremos.

Estes resultados autorisam a conclusão de que a via intramuscular, na cobaia, é, para as amostras brasileiras de virus, uma excelente via de infecção.

A via subcutanea póde excepcionalmente infetar a diluições mais ou menos altas, como 1 p. 100 em um caso e 1 p. 2.000 em outro caso, tendo falhado as inoculações com emulsões a 1 p. 1.000 — 1 p. 3.500 — 1 p. 5.000; mas fornece resultados muito irregulares para permitir organisar qualquer experiência. O periodo de incubação é habitualmente mais longo, passando a 70-90 horas.

## IV — ESTUDO CLÍNICO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Os dados acima expostos levam-nos agora a fazer uma revisão da sintomatologia da doença na cobaia.

O periodo de incubação, controlado em 37 cobaias inoculadas por via muscular, póde descer a 44 horas e póde ser assim distribuido pelas diversas cobaias de vários lotes inoculados:

| | |
|---|---|
| Incubação de 44 horas . . . . . . . . . | 1 caso |
| " " 45 " . . . . . . . . . | 4 casos |
| " " 48 " . . . . . . . . . | 6 " |
| " de 72 " . . . . . . . . . | 2 " |
| " de 50-70 " . . . . . . . . . | 21 " |
| " " 4 dias . . . . . . . . . | 1 caso |
| " " 5 " . . . . . . . . . . | 1 " |
| " " 9 " . . . . . . . . . . | 1 " |

A duração da doença é, em média, de 4 a 18 horas. Excepcionalmente, em um caso, a evolução alcança cerca de 27 horas. A evolução é sempre fatal por essa via.

Em experiências em série, em trabalhos de rotina, é conveniente iniciar o éxame do lote de cobaias inoculadas logo a partir de 42-44 horas, a contar do momento da inoculação. Surpreende-se então o início

dos sintomas caracteristicos, traduzidos por um estado de inquietação, sensação de medo, agitação, corridas na gaiola e contrações da pata inoculada, sob a forma de coices no chão e gritos, como se o animal experimentasse uma fisgada local. A utilidade de um controle precoce está no fato de algumas cobaias sucumbirem a uma invasão do virus antes que uma lesão local, dada pela coceira, se constitúa, ou no momento em que ha apenas uma lesão local discreta, sob a forma de uma arranhadura com depilamento ligeiro, em tôrno do ponto inoculado. Uma certeza da *causa mortis* é assim é sempre assegurada, sem necessidade de passagens.

Sintômas — O quadro clínico torna-se muito caracteristico desde o início, quando se tem a oportunidade de observa-lo uma vez, em um lote de cobaias. Os primeiros indícios vagos são dados por um estado de inquietação que traduz sensação incomoda e dolorosa. O animal sofre e reage por um estado de agitação e por gritos frequentes e curtos. Sobrevêm logo um estado mais definido de dôr local, sob a aparência de fisgadas, que obrigam o animal a bater a pata do lado inoculado, em contrações sob a forma de coices frequentes acompanhados de gritos. Ha tremores generalisados, sacudindo todo o corpo. Só mais tarde o prúrido parece instalar-se definitivamente, localisado: a intervalos, a cobaia coça e morde o ponto inoculado, ou a região da garupa. Pode-se ver mesmo que o animal dá uma primeira dentada num determinado ponto da pata e depois uma série de dentadas pela perna acima, até a garupa, virando-se para coçar-se do outro lado, à procura de um ponto pruriginoso movel. O equilíbrio do corpo perde-se nas manobras que realisa para que os dentes atinjam o ponto sensivel, e ela cáe e rola e se levanta, para correr desassossegada, voltando a bater de novo a pata contra o chão. Ha fazes tranquilas.

O quadro é mais impressionante do que no coelho porque ha agitação mais intensa, gritos, tremores musculares.

As vezes o prurido é discreto e ao nivel do ponto de inoculação pode-se ver que a pele está apenas ligeiramente depilada e irritada. Mas geralmente, quando os animais não são sacrificados no início, uma lesão extensa e mais ou menos profunda se instala.

* * *

As vantagems da via intramuscular na cobaia podem, pois, ser assim resumidas:

I — Regularidade de resultados positivos, até diluições relativamente altas.

II — Periodo de incubação regular e curto, entre 2-3 dias.

III — Constância do prurido local, que facilita leitura dos resultados.

## CONCLUSÕES

I — Si as investigações recentes confirmarem e completaram a velha noção de que o coelho é o animal de eleição no estudo da doença de Aujeszky, — é inegavel, que a cobaia tem, em casos especiais, uma grande utilidade na rotina do laboratório que se ocupa do assunto. E' conveniente, pois, fixar as indicações do seu uso e os casos em que o seu emprego é contra-indicado de todo.

II — As restrições essenciais ao uso de cobaias são de duas ordens: não realisar passagens em série, quando o virus sofre modificações de sua patogenicidade; utilisar uma via de inoculação sevéra e de resultados constantes.

III — Ha uma menor patogenicidade das amostras brasileiras de virus por via subcutanea, quando comparadas com a amostra Aujeszky. O fato parece comum às amostras americanas. O uso dessa via é contra indicado.

IV — A via intramuscular se mostra sevéra, de resultados seguros e a DLM póde ser tomada, aproximadamente, como sendo de 1 cc. de uma emulsão a 1 p. 2.500. Diluições mais altas ainda podem ser regularmente letais. A constância do prurido local é impressionante e facilita a leitura dos resultados.

V — A grande utilidade desta via está na rotina da pesquisa de anticorpos neutralisantes no sôro sanguineo de animais que passam por uma infecção. Ela serve, pois, ao diagnóstico de infecção por esta técnica. Os resultados no coelho não se superpõem aos resultados obtidos na cobaia, em experiências visando pesquisa e dosagem de anticorpos protetores no sôro.

## THE GUINEA PIG IN THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE AUJESZKY'S DISEASE

### *Abstract*

*The great sensibility of the rabbit to the virus of Aujeszky's disease, and the advantages this animal offers for the study of the virus are well known. The guinea pig occupies a secundary place, as it is less sensible. Shopes's studies about the modifications observed in the virus after passages through the brain of guinea pigs showed that its use is restricted. Nevertheless, the guinea pig has, in special cases, a great usefulness and occupies even a well determined place in the routine of the laboratory that deals with this disease. It shows a great*

*sensibility when the route is conveniently chosen. There is a smaller pathogenicity of the Brazilian strains of the virus when inoculated subcutaneously into guinea pig, and this fact seems to be common tho the American strains, when compared to the Aujeszky's strain. This inoculation route is not recommended. The intramuscular inoculation is much stronger, giving constant results. The M L D is about 1 cc. of an emulsion at 1/2.500.*

*The great advantage the guinea pig offers in the routine of this study lies in its use for the research of neutralizing antibodies in the sera of pigs, when it is impossible to use the subcutaneous route, and when the results in rabbits, using the same doses, are not the same.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — Carneiro, V. — 1939 — Anticorpos neutralisantes do virus da doença de Aujeszky em sôros de porcos no Brasil. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 10, 305-312.

2 — Fröhner, E. y Zwick, G. — 1926 — Patologia y Terapeutica veterinaria, 2, 527. Gustavo Gili, editor, Barcelona.

3 — Gerlach, F. und Schweinburg, F. — 1935 — Experimentelle Untersuchungen über die Aujeszkysche Krankheit. *Zeit f. Infektionskrankheiten der Haust.*, 48, 270.

4 — Gerlach, F. und Schweiburg, F. — 1936 — *Idem, idem*, 50, 84.

5 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1934 — Contribution à l'etude du virus de la maladie d'Aujeszky. (1er memoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 52, 361-405.

6 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1938 — La maladie d'Aujeszky, 1 vol. 204 pp. Masson Cie., Paris.

7 — Sabin, A. — 1935 — The mecanism of immunity to filterable viruses. *Britisch J. Exp. Path.*, 16, 169.

8 — Schmiedhöffer, J. — 1910 — Beiträge zur Pathologie der infectiosen Bulbärparalyse. *Zeitschrift f. Infektionskranh. der Haust.*, 8, 383.

9 — Shope, R. E. — 1931 — An experimental study of "Mad itch" with special reference tho its relationship to pseudorabies. *J. Exp. Med.*, 54, 233.

10 — Shope, R. E. — 1933 — Modifications of the pathogenicity of pseudorabies virus by animal passage. *J. Exp. Med.*, 57, 925.

11 — Shope, R. E. — 1935 — Experiments on the epidemiology of pseudorabies. *J. Exp. Med.* 62, 101-117.

12 — Zwick, W. und Zeller, H. —1911 — Untersuchungen über die sogenannte Pseudowut. *Arb. K. Gesundheitsamte*, 36, 382.

———o———

# OCCURRENCE, PATHOGENICITY, AND TEMPERATURE RELATIONS OF PHYTOPHTHORA SPECIES ON CITRUS IN BRAZIL AND OTHER SOUTH AMERICAN COUNTRIES [1]

H. S. Fawcett [2] and A. A. Bitancourt [3]

With Plates 32-34

## INTRODUCTION

This paper deals for the most part with the occurrence, pathogenicity, and temperature relations of species of Phytophthora isolated in Brazil from November 1936 to March 1937. The isolations made in Argentina, Paraguay, and Uruguay from April 12 to May 10, 1937, are also included. So far as known, the other isolations and accurate identifications of Phytophthora from South American countries include only *Phytophthora parasitica* DASTUR by G. L. FAWCETT (6) in 1922, from foot rot of sweet orange *(Citrus sinensis* OSB.) in Tucuman, Argentina, and by A. S. MÜLLER (21) in 1933 in Viçosa, Brazil, also from foot rot, and *P. palmivora* BUTLER, by G. STAHEL ([4]) from citrus fruit in Surinam (Dutch Guiana). Since then *P. parasitica* has also been isolated from foot rot of "Lima da Persia", a sweet lime *(Citrus aurantifolia* Sw.) and *P. citrophthora* from fruit and from bark of sweet orange at Bella Vista, Argentina ([5]).

The other references in literature to Phytophthora on Citrus in South America as far as can be judged from the literature have been those of isolations not sufficiently identified or observations of lesions of brown rot gummosis or foot rot from which it has been assumed that Phytophthora was the causal agent. The references we have been able to find to Phytophthoras or foot rot-like lesions which were assumed to be caused by Phytophthora are AVERNA-SACCA (2) in 1912, BITANCOURT (3, 4) in 1933 and 1936 in Brazil, NOLLA (22) 1930 in

---

(1) This investigation is part of a collaboration made possible by an invitation from Dr. H. DA ROCHA LIMA of the Instituto Biologico to the first author to spend a half year in Brazil at the above institution. Appreciation is here expressed for the excellent facilities furnished by this institution through its Director and Staff. Other papers covering other phases of the investigations and observations of this period of collaboration so far published may be referred to in the Literature Cited under numbers 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, and 17.

(2) Professor of Plant Pathology and Plant Pathologist in the Experiment Station, University of California Citrus Experiment Station, Riverside, California.

(3) Sub-Director de Biologia Vegetal, Instituto Biologico, São Paulo, Brazil.

(4) Culture sent by G. STAHEL. Letter to H. S. FAWCETT of August 4, 1933. Identified by Dr. C. M. TUCKER, University of Missouri.

(5) Cultures sent by H. A. SPERONI. Letters to H. S. FAWCETT of June 7, 1937 and November 25, 1939.

Colombia, ACOSTA (1) 1931 in Uruguay, and BLANCHARD (5) 1930 in Argentina. The world distribution of Phytophthoras up to 1933 is given by TUCKER (23).

ISOLATION OF PHYTOPHTHORA

The isolations from brown-rot gummosis or foot rot lesions were made for the most part from excised pieces of bark containing both sound and diseased tissues. Small bits were cut out with a sterile scalpel from the indefinite margin of active advancing lesions after flaming the inner surface of the bark and scraping it lightly with a scalpel. These bits were dropped either on the surface of slanted tubes or on petri dishes of solidified nutrient media. Glucose maize or glucose potato agar was used. During trips many of the isolations were made in hotels and private homes using a small alcohol burner, scalpel and tweezers and planting the material directly on agar slants in test tubes measuring 90 by 12 millimeters. A convenient method in difficult cases has recently been reported by KLOTZ and FAWCETT (20). Isolations from infected fruits were made most successfully by dropping whole seeds or bits of the core after flaming the surface of the fruit and cutting into the center. The isolations made in the present investigation are listed below [1]: The first number is that used by the present authors. Numbers in parenthesis are Citrus Experiment Station numbers. Some of these isolations have previously been referred to without definite identifications of species in reports of citrus diseases by the authors (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, and 18).

*Phytophthora citrophthora* (SM. & SM.) LEON.

758 (2012) from a fruit of grapefruit (*C. grandis* OSB.) lying on the soil at Lavras, Minas Gerais, Brazil, December 4, 1936.

823 from a sweet orange fruit (*C. sinensis* OSB.) on the soil at São Paulo, Brazil, February 1, 1937.

864 (2013) from Lima da Persia (sweet lime) fruit *(Citrus aurantifolia* Sw.) at São Paulo, Brazil, February 18, 1937.

85 (2005) from sour orange fruit (*C. aurantium* L.) on the soil at the Missions Ruins of San Ignacio, Misiones, Argentina, April 24, 1937.

157 from foot rot on 40-year-old sweet orange tree at Tucuman, Argentina, May 5, 1937.

*Phytophthora cactorum* DEBARY

767 from lemon fruit (*C. limonia* OSB.) on soil at São Paulo, Brazil, December 15, 1936.

(1) Dr. S. F. ASHBY of the Imperial Bureau of Mycology, Kew, England, kindly made the identification of all these isolates.

778b from orange fruit on soil at São Paulo, Brazil, December 17, 1936.

123 (2006) from lemon fruit, Concordia, Argentina, April 27, 1937.

*Phytophthora parasitica* DASTUR

754 from foot rot on sweet orange tree, Campo Grande near Rio de Janeiro, Brazil, November 22, 1936.

784 from foot rot on sweet orange tree, Sorocaba, São Paulo, Brazil, January 6, 1937.

787b from lemon fruit on the soil at Sorocaba, São Paulo, Brazil, January 6, 1937.

802 from lemon fruit on soil at Piracicaba, São Paulo, Brazil, January 20, 1937.

833 from lemon fruit on soil at Piracicaba, São Paulo, Brazil, February 4, 1937.

834 (2011) from foot rot on sweet orange at São Paulo, Brazil, February 10, 1937.

867 (2007) from foot rot on lemon tree, Coruputuba, São Paulo, Brazil, February 24, 1937.

913 (2010) from orange fruits on soil, Salvador, Bahia, Brazil, March 18, 1937.

26 (2008) from lemon fruit, Asuncion, Paraguay, April 18, 1937.

*Phytophthora palmivora* BUTLER

94 (2003) from foot rot on sweet orange at Santa Inez, Misiones, Argentina, April 24, 1937.

138 (2004) from foot rot on tangerine orange, (*C. nobilis* var. *deliciosa* Sw.) Salto, Uruguay, April 28, 1937.

*Phytophthora cinnamomi* RANDS

866 (2009) from foot rot on young sour orange tree, Guaratinguetá, São Paulo, Brazil, February 24, 1937.

## INOCULATIONS ON TRUNKS OF CITRUS TREES

Inoculations were made on the bark of several species of Citrus by three of the species of Phytophthora isolated from Citrus in Brazil, *Phytophthora citrophthora* (culture 758), *P. cactorum* (culture 767), and *P. parasitica* (cultures 784 and 787). The inoculations were made, as in previous experiments in California by KLOTZ and FAWCETT (19) in 1930, by inserting uniform disks of mycelium grown on a nutrient media into wounds in the bark made by small cork borers, replacing

the disks of bark made by the cork borer, and covering the wound with adhesive tape. These were made on January 28, 1937, and the measurements for table 1 were made for the lemon trees on February 17, 20 days later, and for the other trees on March 1, 32 days later, when the lesions were cut out. With the exception of those on "Lima da Persia", the lesions made by all three species tended to be larger on lemon than on the other hosts, there being less difference with *P. cactorum* and *P. parasitica* than with P. *citrophthora*. It should be noted that *P. cactorum* produced no lesions on "Limão galego" (sour lime: *C. aurantifolia* Sw.), while the other two fungi produced lesions of same general size as on grapefruit in each case. These lesions were typical of those of brown rot gummosis. As is apparent in the table, considerable variation occurred in the size of the resultant lesions on certain individual trees of the same varieties and between the two isolations of *P. parasitica*. In a general way, however, the comparative results for *P. citrophthora* are in agreement with those of previous inoculations for this species in California (19), the lemon showing the largest lesions, the grapefruit (*C. grandis* Osb.) and Valencia orange (*C. sinensis* Osb.) averaging less, and the tangerine averaging still much less. The "Lima da Persia" (sweet lime: *C. aurantifolia* Sw.) showed a large lesion next in size to the lemon and both the "Limão Galego" and "Limão Cravo" (Rangpur lime: *C. aurantifolia* Sw.) had lesions comparable to those of most of the oranges.

The inoculation with *Phytophthora cactorum* showed somewhat comparable results except that most of the lesions were smaller. The lesion made by *P. cactorum* on Lima da Persia (Plate 34, V) was as large as the average of the lemons (Plate 32, B and F).

In inoculations made with *Phytophthora parasitica* there appear smaller differences between those on lemons (Plate 32, C, D, G and H) and those on oranges (Plate 33, O and P) than in case of the other two fungi.

On tangerines and "Limão cravo" the lesions are of about the same order as for those of the other two fungous inoculations. The largest lesion made by any of the three fungi was that on "Lima da Persia" (Plate 34) by *Phytophthora parasitica* (Plate 34, W) and measured 180 mm long and 45 mm. wide. The average of all the lemon lesions for *P. citrophthora* is only 121 mm long and 22 mm wide. The two isolates of *P. parasitica* showed differences in their effect on "Laranja Cravo" and "Pera orange", with small lesions or none for culture 784 and fair sized lesions for 787. Because of the variability in this table it is unsafe to draw too definite a conclusion. More extensive

tests would be necessary. It may be said, however, that in general the results from *P. citrophthora* are in line with those obtained in previous tests with this species (19).

TABLE 1

Measurements in millimeter of lesions produced in 20 days (lemon trees) and 32 days (other trees) by inoculation of the bark of the trunk of citrus trees with cultures of Phytophthora species (Plates 32 to 34). Where no number is mentioned, inoculations were not made.

| Variety | Tree n.º | P. citrophthora culture 758 | | P. cactorum culture 767 | | P. parasitica culture 784 | | P. parasitica culture 787 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | L* | W* | L* | W* | L* | W* | L* | W* |
| Limão Cravo . . . (Rangpur Lime) | — | 32 | 7 | 25 | 6 | 22 | 6 | 12 | 4 |
| Limão Galego . . | 35 | 45 | 8 | 0 | 0 | 16 | 8 | 30 | 9 |
| Lima da Persia . . (Sweet Lime) | 46 | 110 | 25 | 82 | 20 | 180 | 45 | 9 | 6 |
| Tangerina do Rio . | 154 | 27 | 10 | 13 | 7 | 15 | 6 | 15 | 7 |
| » » » . . | 153 | 7 | 6 | 12 | 6 | 10 | 6 | 18 | 7 |
| Laranja Cravo . . | 163 | 48 | 10 | 42 | 9 | 0 | 0 | 25 | 7 |
| » » . . | 162 | 45 | 9 | 35 | 8 | — | — | — | — |
| » » . . | 161 | — | — | — | — | 9 | 6 | 20 | 7 |
| Laranja Pera . . . | 136 | 20 | 6 | 18 | 5 | — | — | — | — |
| » » . . . | 135 | 40 | 8 | 6 | 5 | 6 | 5 | 18 | 7 |
| Valencia Orange . . | 83 | 95 | 14 | 45 | 11 | — | — | — | — |
| » » . . | 82 | 30 | 12 | 85 | 11 | — | — | — | — |
| Navel (Bahia) Orange | 12 | — | — | — | — | 15 | 6 | 75 | 8 |
| » (Washington) » | 11 | 20 | 10 | 21 | 8 | — | — | — | — |
| Marsh Grapefruit . | 22 | — | — | — | — | 7 | 8 | 32 | 20 |
| » » . | 16 | 56 | 15 | 16 | 8 | — | — | — | — |
| » » . | 15 | 54 | 18 | 25 | 12 | 32 | 19 | 25 | 12 |
| Eureka Lemon . . | 55 | 105 | 15 | 45 | 12 | 11 | 6 | 35 | 8 |
| Villa Franca Lemon | 72 | 147 | 15 | 48 | 11 | 35 | 8 | 60 | 10 |
| » » » | 66 | 131 | 22 | 72 | 25 | 30 | 14 | 60 | 10 |
| Sicilian Lemon . . | 76 | 162 | 54 | 101 | 30 | — | — | — | — |
| » » . . | 75 | 137 | 16 | 85 | 7 | 20 | 10 | 75 | 16 |
| » » . . | 74 | 45 | 10 | 78 | 10 | — | — | — | — |

L* length. W* width

INOCULATIONS OF FRUITS

On February 26, 1937, at São Paulo, inoculation experiments were made on fruits without injuries in the following manner: By the method of FAWCETT and KLOTZ (17) sporangia which had been induced

to form in a shallow layer of water by transferring mycelium from a culture in dilute prune juice were subjected first to 30° C for 5 minutes and then dropped quickly to 15° C. In all the dishes except that of *Phytophthora cactorum* swarm spores were seen in 15 minutes to one hour. These suspensions were then diluted with water at 15° to 18° C and citrus fruits were immersed in the diluted suspensions. In each suspension 5 to 6 lemons, 3 oranges, and 1 grapefruit were immersed, some for 5 minutes and some for 20 hours. These were left in a moist atmosphere of the laboratory probably at about 25° to 30° C. The results were as follows:

TABLE 2

Infection of citrus fruits by swarm spores of species of Phytophthora.

| Culture n.º | Organism | Reading made after | Fruits infected and results |
|---|---|---|---|
| 758 | *P. citrophthora* | 7 days | 5 min. exposure: 2 lemons, 1 orange. |
| | | | 20 hr. exposure: 3 lemons, 2 oranges and the grapefruit (2 of oranges entirely involved). |
| | | 10 days | All fruits (6 lemons, 3 oranges and the grapefruit) affected with characteristic rot and odor. |
| 767 | *P. cactorum* | 7 days | No effect on any fruits. |
| | | 10 days | 1 lemon fruit only affected. |
| 784 | *P. parasitica* | 7 days | 1 lemon only. |
| | | 10 days | 1 lemon and the grapefruit. |
| 787 | *P. parasitica* | 7 days | 1 lemon and the grapefruit. |
| | | 10 days | 1 lemon, 1 orange, and the grapefruit. |
| 754 | *P. parasitica* | 7 days | 20 hr. exposure: 1 lemon only. |
| | | 10 days | 5 min. exposure: 1 orange |
| | | | 20 hr. exposure: 1 lemon, 1 orange. |

Under the conditions of the experiment *Phytophthora citrophthora* rotted all the fruits while the others caused rotting of only 1 to 3 fruits each. The characteristic odor of the decay was weaker and less well defined in fruits inoculated with *P. parasitica* and *P. cactorum* than in those with *P. citrophthora*.

GROWTH-TEMPERATURE RELATIONS

For the temperature tests, circular disks of mycelium were placed on the center of petri dishes of maize agar, which were then placed in seven different temperature chambers at 5°, 10.5°, 17.5°, 24°, 28°, 31°, and 35° C, respectively. Two dishes of each different

isolation were placed in the chambers at 10.5°, 17.5°, 24°, 28°, and 31°, and one each in the chambers 5° and 35°. The outline margin of the disk of mycelial growth was traced on transparent cellophane paper at various intervals [1] and the diameters of these tracings were later measured for table 3. None of the cultures grew at 5° C., which is therefore omitted from the table. The measurements were made at the 10.5° C. chamber only at 7 and 9 days. Two of the cultures, *Phytophthora cinnamomi* (866) and one of the *P. parasitica* (784), failed to show any growth at 10.5° during the period of observation.

As will be noted in table 3, *Phytophthora citrophthora* made greatest growth at 24° C and next at 28° C. This would indicate that the optimum temperature under the conditions of this experiment was somewhere between 24° and 28° C. For *P. citrophthora* this was possibly about 26° C as was the case in previous California experiments by the first author (7, 8) with another isolation. *P. cactorum* (767) made the greatest growth at 28° C but only slightly more than that at 24° C. Both grew slowly at 10.5° but failed to grow at 5° or 35° C. The same relationship was shown by tests made by VINCENT A. WAGER [2] with a transfer of the same fungus a year or more later. *P. cactorum* failed to grow at 31° C. *P. cinnamomi* (866) failed to grow at 5° C, 10.5° C, or at 35° C. It showed the largest growth at 31° C. The close approach of the growth figures at 28° C and at 31° C indicates that the real optimum under the conditions was probably between these two temperatures. In another test by WAGER the same relationships were evident. The maximum temperature for growth is probably very near 35° since WAGER [2] got a fair growth with the same isolate at 34° but none at 37° C.

The results for the three *Phytophthora parasitica* isolations show the greatest growth at the temperature of 31° C. This optimum temperature and the wider range indicated is also in agreement with previous temperature experiments by the first author (7, 8) with this species. *P. parasitica* is the only one of the four species that grew at 35° C, at which temperature all three isolations made a considerable advance. Although the three isolations showed differences in the rates of growth among themselves, their relative responses to temperature were similar except that culture 784 failed to grow at 10.5° C at which the other two made a feeble growth after 7 and 9 days. Another test by WAGER [2] showed a relationship with culture 834 similar to that for 784, with no growth at 10° C but with a feeble growth at 13° and at 37°.

---

(1) We are indebted to EUCLIDES RACT for careful tracing of these cultures.
(2) Letter of September 15, 1939.

TABLE 3

Measurements in mm of diameters of mycelial disks of growth at different temperatures. Two petri dishes (a and b) and average (av).

| | | days | 10.5° C | | | 17.5° C | | | 24° C | | | 28° C | | | 31° C | | | 35° C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | a | b | av | a | b | av | a | b | av | a | b | av | a | b | av | a | b | av |
| 758 | *Phytophthora citrophthora* | 3 | — | — | — | 22 | 21 | 21.5 | 32 | — | 32 | 30 | 25 | 27.5 | 25 | 24.5 | 25 | 0 | 0 | 0 |
| | | 5 | — | — | — | 40 | 32 | 36 | 48 | — | 48 | 38 | 46 | 41 | 38 | 35 | 36.5 | 0 | 0 | 0 |
| | | 7 | 26.5 | 25.5 | 26 | 51 | 40 | 45.5 | 60 | — | 60 | 50 | 56 | 53 | 47.5 | 53 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| | | 9 | 29 | 28.5 | 29 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 767 | *P. cactorum* | 3 | — | — | — | 26.5 | 26.5 | 26.5 | 42.5 | 34.5 | 38 | 42.5 | 40.5 | 41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 5 | — | — | — | 49 | 50 | 49.5 | 63.5 | 70 | 67 | 73.5 | 75 | 74 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 7 | 19 | 19 | 19 | 71 | 74 | 72.5 | 83.5 | 86.5 | 85 | 85.5 | 87 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 9 | 29 | 28.5 | 29 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 866 | *P. cinnamomi* | 3 | — | — | — | 18 | 17.2 | 18 | 34 | 35 | 34.5 | 44.5 | 40.5 | 42 | 45.5 | 45 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| | | 5 | — | — | — | 33 | 34.5 | 34 | 52 | 58 | 55 | 71.5 | 65 | 68 | 72 | 76.5 | 74 | 0 | 0 | 0 |
| | | 7 | 0 | 0 | 0 | 47 | 49 | 48 | 74 | 76 | 75 | 88 | 89 | 85.5 | 86 | 90 | 88 | 0 | 0 | 0 |
| | | 9 | 0 | 0 | 0 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 784 | *P. parasitica* | 3 | — | — | — | 18.5 | 18.5 | 18.5 | 16 | 18 | 17 | 22 | 28 | 25 | 29 | 32 | 30.5 | 15.5 | — | 15.5 |
| | | 5 | — | — | — | 28.5 | 28.5 | 28.5 | 33 | 37 | 35 | 44 | 50 | 47 | 50 | 52 | 51 | 28.5 | — | 28.5 |
| | | 7 | 0 | 0 | 0 | 35 | 36.5 | 36 | 50 | 52 | 51 | 60 | 70 | 65 | 71 | 72 | 71.5 | 36.5 | — | 36.5 |
| | | 9 | 0 | 0 | 0 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 867 | *P. parasitica* | 3 | — | — | — | 17 | 21 | 19 | 23 | 20 | 21.5 | 26 | 23.5 | 25 | 30 | 26.5 | 28 | 23 | — | 23 |
| | | 5 | — | — | — | 22 | 31 | 26.5 | 35.5 | 32 | 34 | 42 | 37.5 | 40 | 42.5 | 40 | 41 | 31.5 | — | 31.5 |
| | | 7 | 3 | 9 | 6 | 30 | 38 | 34 | 47.5 | 45 | 46 | 52.5 | 50 | 51 | 57 | 54 | 55.5 | 39.5 | — | 39.5 |
| | | 9 | 10 | 14 | 12 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 833 | *P. parasitica* | 3 | — | — | — | 20 | 21 | 20.5 | 23 | 23 | 23 | 28.5 | 27.5 | 28 | 25.5 | 34.5 | 30 | 25.5 | — | 25.5 |
| | | 5 | — | — | — | 29 | 29 | 29 | 40 | 39 | 39.5 | 46 | 47 | 46.5 | 53 | 62 | 58 | 42.5 | — | 42.5 |
| | | 7 | 6.5 | 9.5 | 8 | 34 | 35 | 34.5 | 60 | 60 | 60 | 75 | 75 | 75 | 73 | 80.5 | 77 | 61 | — | 61 |
| | | 9 | 8.5 | 14 | 11 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

A dash (—) indicates that no observations were made.
A zero (0) indicates that observations were made but no growth was observed.

A test with *Phytophthora palmivora* (culture 94) from Argentina by WAGER showed a similar range to 834 with no growth at 10° C but a diameter growth of 7 mm at 13°, 17 mm at 16°, 34 mm at 19°, 44 mm at 22°, 50 mm at 25°, 47 mm at both 28° and 31°, 34 mm at 34°, and 8 mm at 37° C.

SUMMARY AND DISCUSSION

Five species of Phytophthora up to the present time have been isolated and identified from Citrus in South America, namely, *Phytophthora citrophthora*, *P. parasitica*, *P. cactorum*, *P. palmivora*, and *P. cinnamomi*. *P. citrophthora* has been isolated in three localities in Brazil and three localities in Argentina; *P. parasitica* in seven localities in Brazil, two in Argentina, and one in Paraguay; *P. cactorum* in two places in Brazil and one in Argentina; *P. palmivora* in one locality in Argentina, one in Uruguay, and one in Dutch Guiana; and *P. cinnamomi* has been isolated in one locality in Brazil. As far as known, *P. cinnamomi* has not been isolated previously from Citrus in any country. It is also the only Phytophthora species that has been found producing comparatively extensive lesions on sour orange. Assuming that *P. citricola* is the same species as *P. cactorum*, this species under the name of *P. citricola* has been isolated before only in Japan and South Africa.

Inoculations into citrus trees at São Paulo with three of these species showed, in spite of variations between individual trees of the same variety, differences that were probably related to differences in species of both the parasites and the hosts. The results with *Phytophthora citrophthora* were comparable to those obtained in previous experiments in California in which the lemon was the most susceptible with orange and grapefruit less susceptible and tangerine still less.

Inoculation of a small number of fruits kept at temperatures from 25° to 30° C gave the following results: Infection of all fruits with *Phytophthora citrophthora*, 2 to 3 fruits out of 7 with each of 3 isolates of *P. parasitica*, and only 1 fruit out of 7 with *P. cactorum*. *P. cactorum*, although present in California on walnuts *(Juglans regia)*, has not been found in the field on citrus fruits or bark except as *P. citricola* in Japan and South Africa and does not infect such fruits readily under artificial inoculations.

Four of the species tested for growth in relation to temperature showed certain marked difference as to range and as to optimum temperature. With the temperatures used *Phytophthora citrophthora* showed a much wider range of temperature for growth than did either

*P. cactorum* or *P. cinnamomi.* The results with both *P. citrophthora* and *P. parasitica* agree well in general with the growth temperature relations previously tested in California for other isolates of these species.

SUMARIO

Até a presente data foram isoladas e identificadas na America do Sul cinco especies de Phytophthora, *Phytophthora citrophthora, P. parasitica, P. cactorum, P. palmivora* e *P. cinnamomi. P. citrophthora* foi isolada de especimens provenientes de 3 localidades do Brasil e de 3 da Argentina, *P. parasitica* de 7 localidades do Brasil, 2 da Argentina e uma do Paraguay, *P. cactorum* de duas do Brasil e uma da Argentina *P. palmivora* de uma da Argentina, uma do Uruguay e uma da Guiana Holandeza e *P. cinnamomi* de uma do Brasil. Ao que se saiba é essa a primeira vez que *P. cinnamomi* foi isolado de Citrus. E' igualmente a unica especie de Phytophthora que foi encontrada até hoje produzindo lesões relativamente extensas em laranjeira azeda. Admitindo-se que *P. citricola* não passa da mesma especie que *P. cactorum,* esta ultima, sob o primeiro nome, foi isolada anteriormente, de Citrus, sómente no Japão e na Africa do Sul.

As inoculações feitas em São Paulo com 3 dessas especies mostraram apesar de algumas variações observadas entre arvores da mesma variedade, diferenças que são provavelmente relacionadas com diferenças nas diversas especies do parasita e do hospede. Os resultados obtidos com *P. citrophthora* são comparaveis aos obtidos em experiencias anteriores, na California, onde se verificou que o limoeiro era a especie a mais suscetivel, sendo menos suscetivel que ele, na ordem decrescente a laranjeira doce, o pomelo e a tangerineira.

Inoculações efetuadas em pequeno numero de frutas conservadas á temperatura de 25 a 30° C deram os seguintes resultados: Infeção em todas as frutas com *P. citrophthora,* em 2 a 3 frutas sobre 7 com cada um dos 3 isolamentos de *P. parasitica* e somente uma fruta sobre 7 com *P. cactorum. P. cactorum,* bem que presente na California na nogueira européa, não foi encontrada, em condições naturais, em frutas, ou na casca do tronco ou ramos, de Citrus. No Japão e na Africa do Sul, entretanto, esta espécie, foi assinalada sobre Citrus sob o nome de *P. citricola.* Ela infecta dificilmente as frutas nas inoculações artificiais.

O crescimento de 4 dessas espécies foi estudado em relação á temperatura, verificando-se algumas notaveis diferenças entre as mesmas, tanto na extensão da faixa de temperaturas em que crescem, como na temperatura ótima de crescimento. *P. citrophthora* mostra maior de-

senvolvimento a 24° C, *P. cactorum* a 28° C, *P. cinnamomi* e *P. parasitica* a 31° C. *P. parasitica* mostrou uma faixa de temperatura muito mais extensa que *P. cactorum* e *P. cinnamomi*. Os resultados obtidos com *P. citrophthora* e *P. parasitica* concordam em geral bem com os anteriormente obtidos na California, com outros isolamentos dessas espécies.

## LITERATURE CITED

1 — ACOSTA, D. R. — Investigaciones fitopatologicas. Uruguay. *Min. Indus. Dir. Agron. Publ. Mens.* 1931. 4: 1-18.

2 — AVERNA-SACCÁ, R. — Relatorio da divisão de pathologia vegetal. *Bol. Agr.* (São Paulo). 1912. 13 (3): 208-247.

3 — BITANCOURT, A. A. — A podridão do pé das Laranjeiras (Gomose) Instituto Biológico, Folheto 81. 1936. 15 pp.

4 — BITANCOURT, A. A., J. P. DA FONSECA and M. AUTUORI — Manual de Citricultura. II Parte. Doenças, pragas e tratamentos. Ed. de *Chacaras e Quintaes*. São Paulo. 1933. 212 pp. 183 figs.

5 — BLANCHARD, E. E. — Principales insetos y enfermedades que perjudican los cultivos citricos en la Republica Argentina. *Min. Agr. Nac. Sec. Prop. e Inform.*, Circ. 815. 1930. 114 pp. 8 pl. 43 figs.

6 — FAWCETT, G. L. — La gomosis de los naranjos. *Rev. Indus. y Agr. Tucuman* 1922. 12:149-151. 5 figs.

7 — FAWCETT, H. S. — Temperature relations of growth in certain parasitic fungi. *Univ. of Calif. Publ. Agr. Sci.* 1921. 4: 183-232. 11 figs.

8 — FAWCETT, H. S. — Citrus Diseases and Their Control. 2nd Edition. *McGraw-Hill Book Co.* New York. 1936. 656 pp. 187 figs.

9 — FAWCETT, H. S. — Observations on citrus conditions in Brazil. *Calif. Citrograph.* 1937. 22(10): 456-459. 3 figs.

10 — FAWCETT, H. S. — Contacts with the citrus industry and other observations in South America. *Calif. Citrograph.* 1937. 22: 552-553, 571-572, 575.

11 — FAWCETT, H. S. — Novos rumos no combate a psorose dos Citrus. *O Biológico, S. Paulo.* 1937. 3(3): 81-84. 2 pl.

12 — FAWCETT, H. S. — Relatorio sobre as doenças dos citrus no Districto Federal, Estado do Rio de Janeiro e Minas Geraes. Introdução. *Rodriguesia* (Rio de Janeiro) Dec.-March 1936-1937. 2(7): 329-332.

13 — FAWCETT, H. S., and A. A. BITANCOURT — Relatorio sobre as doenças dos Citrus nos Estados de Pernambuco, Bahia, São Paulo e Rio Grande do Sul. *Rodriguesia.* 1937. 3(10): 213-236.

14 — FAWCETT, H. S., and A. A. BITANCOURT — As doenças dos citrus no Estado de Pernambuco. *Bol. Sec. Agr. Ind. e Com. Pernambuco.* Sept. 1937. 2: 317-326.

15 — FAWCETT, H. S., and A. A. BITANCOURT — Observaciones sobre las enfermedades de los citrus en el Uruguay. *Rev. Asoc. Ing. Agr.* (Montevideo), 1940. 12 (3): 3-8.

16 — FAWCETT, H. S., H. V. S. GRILLO, and A. A. BITANCOURT — Relatorio sobre as doenças dos citrus no Distrito Federal, Estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais. I. Districto Federal e Estado do Rio de Janeiro. *Rodriguesia* (Rio de Janeiro) Dec.-March 1936-1937. 2 (7): 332-340.

17 — FAWCETT, H. S., and L. J. KLOTZ — A procedure for inducing the production of the sporangial and swarm stages in certain species of Phytophthora. *Phytopathology*. 1934. **24**: 693-694.

18 — FAWCETT, H. S., and A. S. MÜLLER. — Relatorio sobre as doenças dos citrus no Distrito Federal, Estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais. II. Estrada de Minas Gerais. *Rodriguesia* (Rio de Janeiro) Dec.-March 1936-1937. 2(7): 340-344.

19 — KLOTZ, L. J. and H. S. FAWCETT — The relative resistance of varieties and species of Citrus to Pythiacystis gummosis and other bark diseases. *Jour. Agr. Research*. 1930. **41**: 415-425.

20 — KLOTZ. L. J. and H. S. FAWCETT — Isolation of *Phytophthora* spp. *Phytopathology*. 1939. **29**: 290-291.

21 — MÜLLER, A. S. — Observations and notes on citrus diseases in Minas Geraes, Brazil. *Phytopathology*. 1933. **23**: 734-737.

22 — NOLLA, J. A. B. — Chapter on plant diseases *in* C. E. CHARDON: Reconocimiento Agro-pecuario del Valle del Cauca. 342 pp. San Juan, Puerto Rico. pp. 306-330. 1930.

23 — TUCKER, C. M. — The Distribution of the genus *Phytophthora*. *Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bul.* 184. 1933.

## EXPLANATION OF THE PLATES

### Plate 32

Excised bark of *Citrus limonia*. OBS. (Villafranca lemon, *A-D* and Eureka lemon, *E-H*) showing lesions at cambium side after 20 days from inoculations with *Phytophthora citrophthora (A* and *E)*, *P. cactorum (B* and *F)*, and two different isolates of *P. parasitica* (*C* and *G*, *D* and *H*) × 7/10.

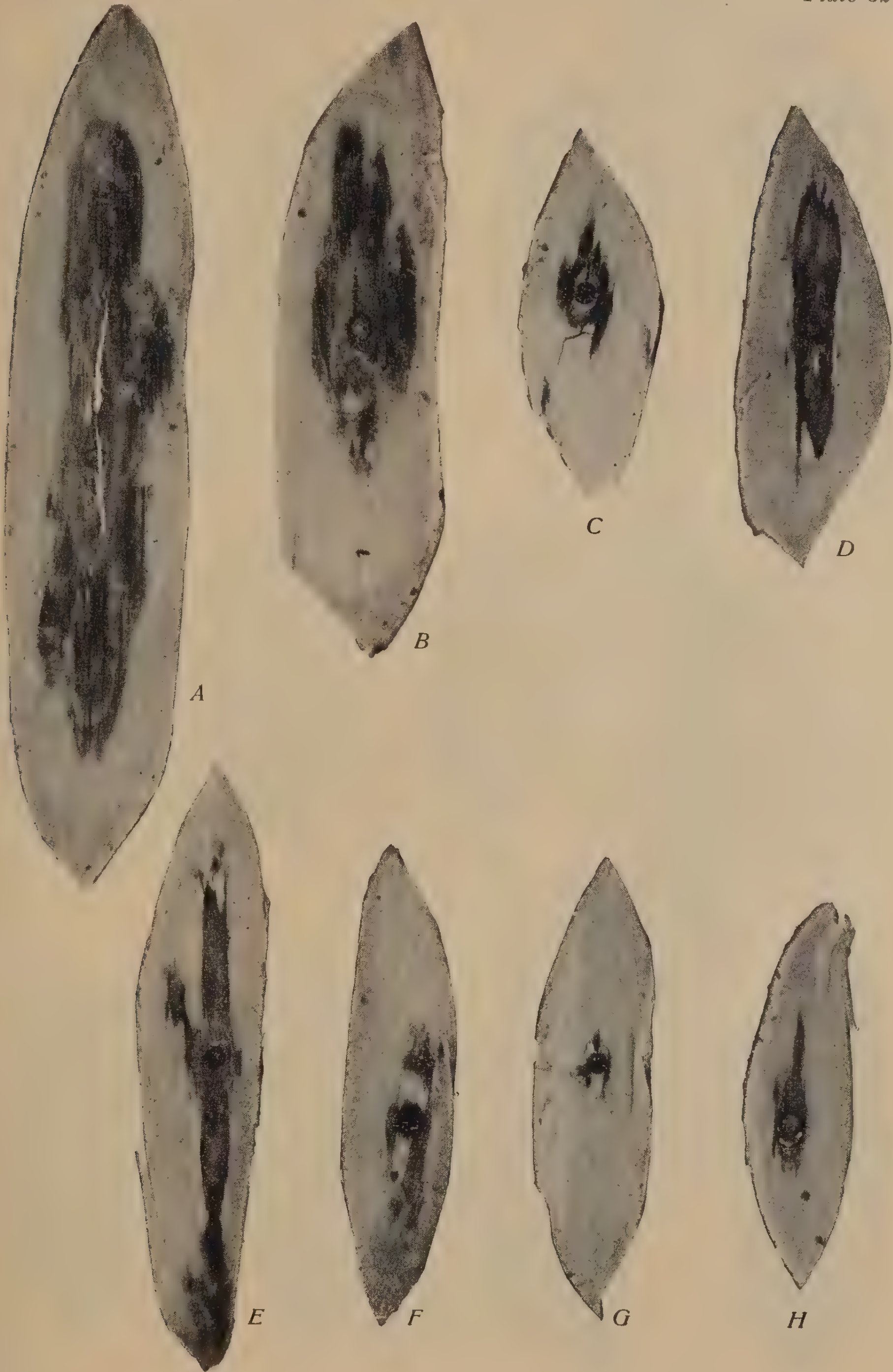
### Plate 33

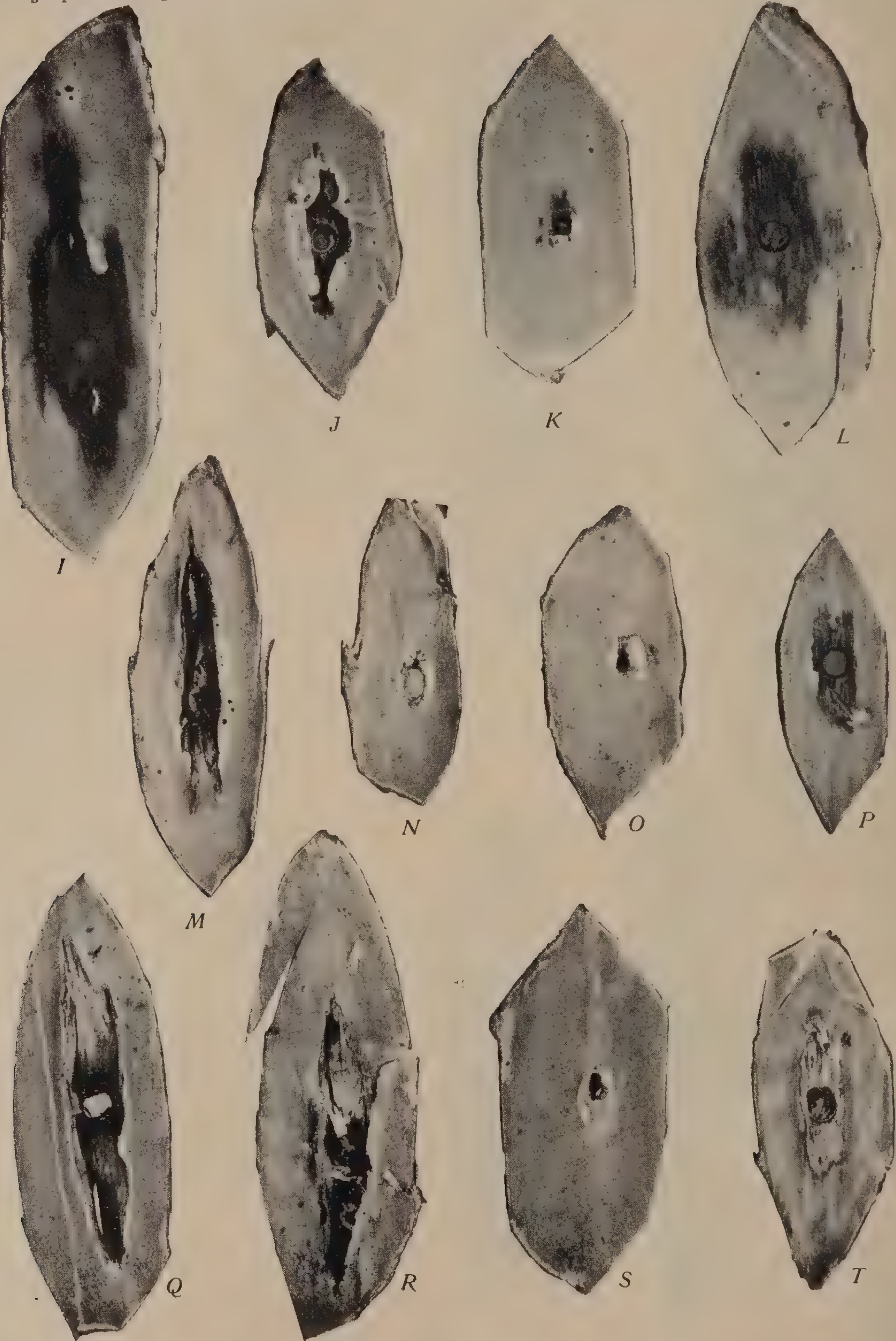
Excised bark of Marsh Seedless Grapefruit *(Citrus grandis, I-L)*, Sweet orange var. Pera *(Citrus sinensis, M-P)* and "laranja cravo" *(Citrus nobilis* var., *Q-T)* showing lesions at cambium side after 32 days from inoculations with *Phytophthora citrophthora (I, M* and *Q)*, *P. cactorum (J, N* and *R)* and two different isolates of *P. parasitica (K, O* and *S, L, P* and *T)* × 1.

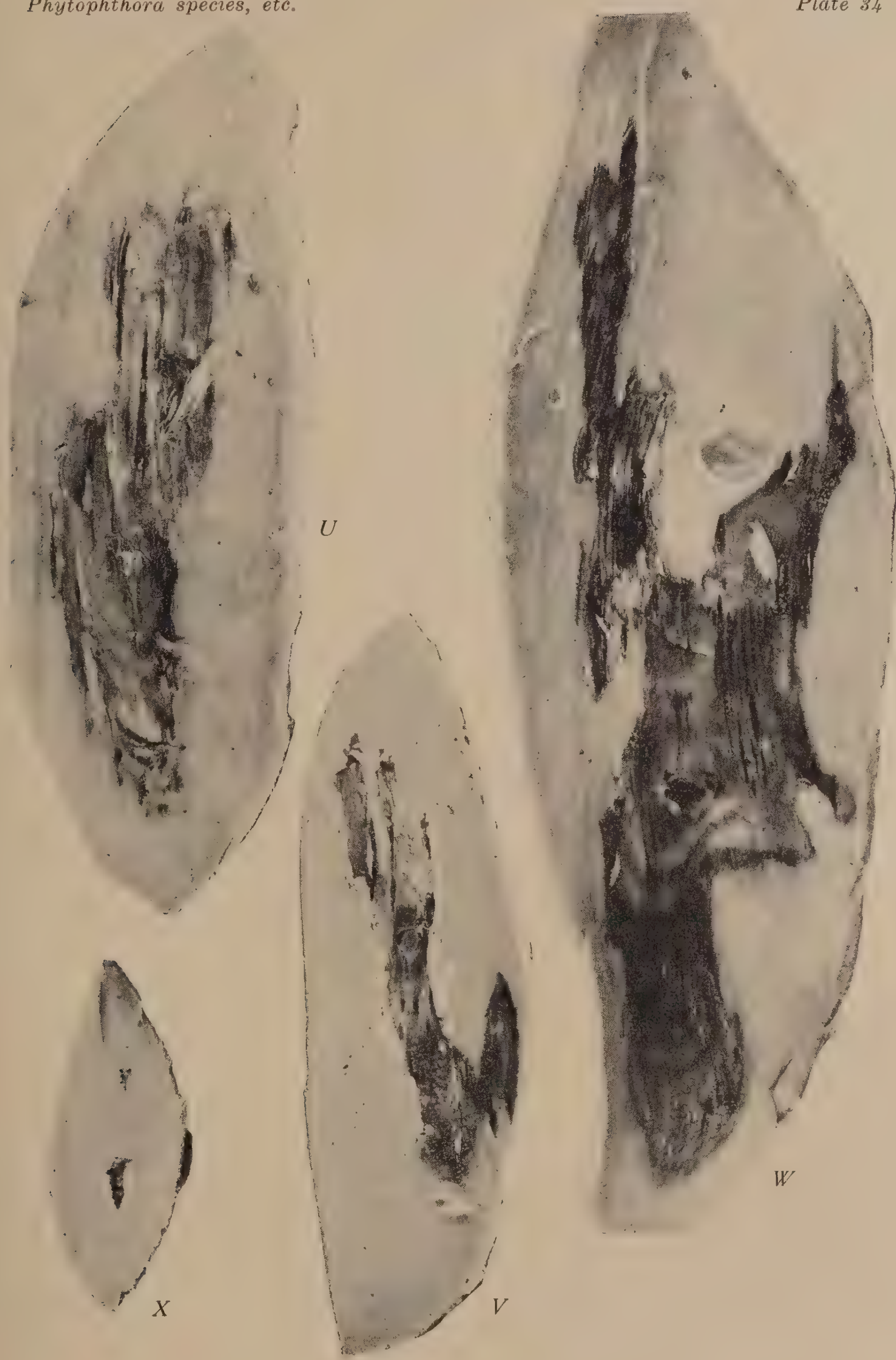
### Plate 34

Excised bark of "Lima da Persia" *(Citrus aurantifolia)* showing lesions at cambium side after 32 days from inoculation with *Phytophthora citrophthora (U)*, *P. cactorum (V)*, and two different isolates of *P. parasitica (W* and *X)* × 4/5.

———o———


A
B
C
D
E
F
G
H


I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T


U
W
X
V

# ACTINOMICOSE DOS ORGÃOS GENITAIS INTERNOS, FEMININOS

POR

Amadeu Fialho

Do Departamento de Tuberculose - Serviço de Anatomia Patologica, Rio de Janeiro

Com as estampas 35-38

Em 1937, com GUERREIRO DE ALMEIDA, publicámos o primeiro caso, que vimos, de actinomicose primitiva das trompas. Embora seja mais frequente do que pensamos, a localisação genital desta terrivel micose é relativamente rara, pois naquele nosso trabalho a revisão bibliografica permitiu o registro de 72 casos, apenas.

Outro trabalho nacional sôbre este assunto, não conhecemos. As publicações argentinas que consultámos a respeito, tambem nada citam. Os estudos brasileiros e das outras nações sul-americanas sôbre actinomicose, no entanto, são em numero regular, mas quasi todos referem-se ás localisações nos membros e, mais raramente, no tronco, mas sem comprometimento genital.

PABLO NEGRONI, conhecido micólogo argentino, organisou o seguinte quadro, referente a 50 casos:

| | | |
|---|---|---|
| Localisações | na cabeça e pescoço . . . . . . | 62% |
| " | nos membros inferiores . . . . . | 14% |
| " | pleuro-pulmonares . . . . . . . | 12% |
| " | abdominais . . . . . . . . . . | 8% |

A maior estatistica levantada no Brasil é a do nosso consagrado patricio FLORIANO DE ALMEIDA.

E' a seguinte e compreende 108 observações:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Pé . . . . . . . . . . | 65 | casos . . . . . | 62,96% |
| Perna e joelho . . . . | 17 | " . . . . . | 15,74% |
| Cabeça e pescoço . . . | 6 | " . . . . . | 5,55% |
| Pulmão e torax . . . | 4 | " . . . . . | 3,79% |
| Intestino e abdome . . | 3 | " . . . . . | 2,51% |
| Sem referencia . . . | 10 | " . . . . . | 9,25% |

A estatistica de FLORIANO DE ALMEIDA afasta-se inteiramente da de NEGRONI. A deste ultimo autôr é semelhante, pela distribuição nas regiões corporais, ás estatisticas européas, pois em uma e em outras ha uma grande porcentagem de observações do tipo cervico-facial (62%), o que é raro entre nós, onde há predominancia de localisação nos membros inferiores (62,96% só no pé e mais 15,74% na perna e joelho).

No periodo de vinte anos, mais ou menos, vimos quasi duas dezenas de casos de micetomas, geralmente actinomicoticos, que não constam de nenhuma estatistica e constituirão um trabalho que será em breve publicado.

Com surpresa nossa, da data da publicação que fizemos com GUERREIRO DE FARIAS até hoje, encontrámos mais tres casos ginecologicos, constituindo, assim, um grupo de quatro observações de localisação genital da actinomicose. Tal como tem acontecido com outros observadores, o estudo micologico destes casos não foi feito, porque a micose em questão foi revelada sómente no exame histopatologico.

Passamos agora a descrever os nossos casos.

1.ª Observação: — (Já publicada com GUERREIRO DE FARIAS). Estefania, branca, brasileira, de 35 anos de idade.

Apresenta um corrimento branco-amarelado, ha cerca de 4 anos. Tem dôres abdominais, que se irradiam para o membro inferior direito. Sensibilidade dolorosa á palpação da fossa iliaca direita. Anexos volumosos e tambem sensiveis. Utero pouco movel. Diagnostico: — Metro-salpingo-ovarite e apendicite cronicas.

Foi operada pelo Prof. Castro Araujo. No áto operatorio foi constatada a integridade macroscopica de ambos os ovarios. Trompas volumosas, em parte aderentes ao intestino. Sequencia operativa: — Estabelecimento de um trajeto fistuloso, seguindo a direção em que fôra colocado um dreno. Esta fistula, que permitia o escoamento de abundante exsudato, cicatrisou com o uso intra-venoso de iodêto de sodio, tratamento instituido após o diagnostico do laboratorio.

Relatorio anatomo-patologico (P. C. 5.966): — Trompas espessas, medindo 2 centimetros no maior diametro transverso. Utero sem alterações macroscopicas. Fixação em formol. Aos córtes, as trompas continham exsudato purulento, que se coagulara pelo fixador.

Exame microscopico: — Utero sem alterações microscopicas.

Trompas: — Apresentam um processo inflamatorio acentuado, com exsudato purulento abundante. A mucosa desses orgãos mostra-se proliferada, originando-se formações glanduliformes aberrantes, nas quais se acham celulas plasmaticas, linfócitos e muitos granulócitos. Não foram achadas celulas gigantes, nem reação de tipo tuberculoide. O processo interessa mais a mucosa. As tunicas externas são comprometidas pela fibrose e por infiltração linfocitaria. O exame do segmento de uma das trompas demostrou pequenas formações de contorno arredondado, com 15 mm., (Estampa 35, fig. *A*). O Gram-Weigert permitiu identificar, nestes nodulos, uma proliferação miceliana, sobretudo muito evidente na parte periferica, onde assume distribuição irradiante (Estampa 35, fig. *B*).

O micelio é muito delgado, bifurcando-se frequentemente, e não apresenta clavas. Na parte central dos nodulos, ao lado de fórmas ainda filamentosas, ha outras, pequenas, como cócos. No exsudato observam-se filamentos curtos, baciliformes, ás vezes bifurcados, em Y.

Nenhuma formação semelhante é encontrada na parede da trompa ou no endometrio. Do exsudato das trompas, mesmo coagulado, mediante agitação com sôro fisiologico, foram isolados grãos brancos, tendo, os maiores, 1,5 mm. de diametro.

Diagnostico: — Micetoma actinomicotico das trompas.

Esta paciente, seguida durante alguns anos, é considerada curada.

2.ª Observação: — Paulina, Caso do Dr. Mario da Fonseca. Hosp. S. João Batista. Intervenção cirurgica realisada por ginecopatia cronica. Material examinado: trompa e ovario.

A trompa é volumosa, com cerca de 18 mm. no seu maior diametro. Constitue, na extremidade distal, um blóco com o ovario. Neste ponto ha abundante exsudato (abcesso tubo-ovariano).

Exame microscopico (P. C. 7.904) — A trompa acha-se muito espessada, com fibrose das parêdes, cujos planos musculares estão dissolvidos pelo tecido conjuntivo. Nos planos parietais externos, subserosos, ha grandes acumulos linfocitarios. A submucosa tem acentuada infiltração difusa, plasmolinfocitaria. Quanto mais proximo da cavidade tubaria, tanto mais numerosas são as celulas xantelasmisadas. Somente a mucosa da porção proximal da trompa está ainda presente, mas muito alterada, com grande infiltração por linfócitos e plasmócitos. O exsudato é leucocitario e sem formações parasitarias. Na porção distal, porém, formou-se um largo abcesso, que interessa a trompa e o ovario, que constituem, então, um bloco unico. A parede deste abcesso é, na parte profunda, fibrosa e delgada, mas, em relação com a cavidade, tem o aspecto de um tecido de granulação banal, com capilares, leucócitos, plasmócitos, etc.

E' no exsudato aí coletado que se encontram os elementos parasitarios, sob a fórma de massas irregulares, de um micelio muito fino, gram-positivo, em um emaranhado aqui e ali irregularmente irradiado (Est. 36, fig. *C-D*).

Além destas massas micelianas mais volumosas, outras ha, muito pequenas, verdadeiros grãos microscopicos, cercados por uma corôa leucocitaria. Encontram-se tambem formações ainda menores de tipo bacilar, ás vezes ramificadas, e outras com aspecto de cócos. Estas fórmas parasitarias são vistas só na porção tubo-ovariana. Em nenhum ponto há micelio com clava.

Diagnostico: — Micetoma actinomicotico, tubo-ovariano.

3.ª Observação: — Maria das Dôres. Hospital Estacio de Sá. Prof. Castro Araujo.

Ha cerca de dois meses que vinha sentindo dôres na fossa iliaca direita, com irradiação para o abdome. Notava dificuldade em urinar e defecar. Não apresentava corrimento vaginal. A palpação demonstrou um "tumôr" hipogastrico, que se extendia um pouco para as fossas iliacas. Durante o ato operatorio foi observado que o "tumôr" era formado por uma salpingo-ovarite supurada e um cisto do ovario direito. Um processo de pelve-peritonite provocou aderencias entre estes orgãos, o utero e a parede do grosso intestino.

A paciente faleceu 48 horas após a intervenção. A observação apresenta outros detalhes, que não interessam ao presente trabalho.

Exame anatomopatologico: — P. C. 12.135. O bloco formado pela trompa e pelo ovario constitue uma volumosa massa, cujo maior diametro pouco excede de 10 centimetros. Os detalhes anatomicos destes orgãos desapareceram quasi inteiramente. A trompa apresenta um aspecto sacular, contendo exsudato purulento. Sua parede atinge 1 centimetro de espessura, apresentando fibrose e, em diversos pontos, pequenos abcessos. Sua superficie interna é irregular e de côr amarelada,

Na porção distal ela se confunde com o ovario, originando-se, então, uma formação irregularmente ovoide, fibrosa e com abcessos numerosos, da côr do enxofre, comunicando-se, em muitos pontos, uns com os outros, assemelhando-se aos abcessos que CHAUFFARD descreveu no figado (abcessos areolares; Est. 37, fig. *E*).

As lesões encontradas ao microscopio, constituem, no seu aspecto dominante, um processo produtivo e exsudativo, com apagamento da estrutura normal dos orgãos interessados.

Um tecido fibroso mais ou menos edemaciado é presente e abundante, pobre de nucleos proprios. Pequenas infiltrações linfocitarias são vistas em varios pontos. Da trompa encontram-se somente os planos musculares, espessados mas dissociados pela fibrose. A mucosa foi substituida por um tecido de granulação, com abundantes capilares néoformados, linfócitos, monócitos e leucócitos. Sobre esta camada, que é fina, encontra-se o exsudato, em grande parte desfigurado pela mortificação dos seus elementos celulares. E' na massa fibrosa, propriamente tubo-ovariana, já descrita, que se encontram, nos abcessos isolados ou comunicantes, os grãos parasitarios. Têm forma muito variavel, sendo, em geral, pequenos, de 100 micras, mas constituindo, em alguns pontos, massas maiores, que atingem um mm. no maior diametro, sendo então vistas a olho nú. (Est. 37, fig. *F*).

Apresentam-se como massas de micelio fino, irradiado na periferia, mas sem clavas. Na sua parte central encontram-se formações pequenas, semelhantes a cócos e bacilos. Todos esses detalhes são bem apreciaveis pelo Gram-Weigert.

Diagnostico: — Micetoma actinomicotico, tubo-ovariano.

4.ª Observação: — Daura. Santa Casa. Professor Pedro Moura. Ginecopatia cronica. Salpingo-ovariectomia.

O material é constituido por uma trompa e um ovario formando um bloco indissecavel. A trompa é espessa com 1½ cent. no maior diametro transverso. A parte dital, fundida com o ovario, apresenta uma coleção purulenta, cuja parede tem contorno ondulado e côr amarelada. A trompa está comprometida por um processo de fibrose exuberante, que dissocía os seus planos musculares. Uma infiltração linfocitaria é aí encontrada, discreta, porém, e sob a fórma de pequenos acúmulos. A mucosa está cronicamente inflamada, com dóbras espessas e infiltrada por linfócitos e plasmócitos. Entre eles ha exsudato leucocitario.

O abcesso tubo-ovariano destruíu, ao nivel da sua parêde, a estrutura dos respectivos orgãos. O que aí se encontra é uma camada inflamatoria banal, com infiltração linfo-plasmocitaria, capilares de néoformação e células com lípides, que lhes dão os caracteristicos comuns dos elementos xantelasmisados. O exsudato é leucocitario. A formação parasitaria encontrada é um grão tipico, de aspecto vermicular, com elementos irradiantes e sem clavas. (Est. 38, fig. *G*).

Foi uma surpresa diagnostica, à qual concorreu o acaso feliz da incidencia do córte.

Diagnostico: — Micetoma actinomicotico, tubo-ovariano.

Comentario: — Após a nossa publicação com GUERREIRO DE FARIAS, fizemos uma nova revisão do assunto e encontrámos os seguintes casos, assinalados pelos nomes dos autôres que publicaram: LISSA e LEVINE, 1937; COUNSELER, e HOERNER, em 1934; JUNGHANS, em 1934; GARDINER e WELSH, em 1935 e HÜSSY em 1935.

Reunindo aos casos da literatura a nossa observação pessoal, tivemos naquela primeira publicação, 73 casos.

Adicionando a estes, não só os da literatura internacional, acima citados, como as observações agora descritas, obtemos o total de 81 casos de localisação genital interna, feminina, de actinomicose.

O numero de casos desta micose deve ser, porém, muito maior, mas não ha sintomas reveladores da sua especificidade, tendo sido sempre estabelecido o diagnostico de uma ginecopatia cronica, ás vezes com eliminação de bastante exsudato. O laboratorio é que tem permitido o diagnostico correto, mas frequentemente em material já fixado, o que acarretou, até agora, grande dificuldade no seu estudo micologico. Os nossos casos são todos de parasitas sem clavas. Estas pesquizas têm dependido do acaso, pois em muitos casos apenas em um ou outro ponto são verificadas as formações parasitarias.

A patogenia destas lesões é obscura. Os cogumelos podem chegar até essas reconditas regiões por via sanguinea, linfatica e talvez por via direta, ora por propagação de orgãos apenas vizinhos, como o intestino, ora por via ascendente. Esta ultima hipotese é possivel, mas com certeza é a que se realiza no menor numero de casos, porque frequentemente o utero é normal, mesmo com os anexos muito comprometidos, como nas nossas observações.

Restam, como mais frequentes, as duas vias circulatorias; a linfatica e a sanguinea, pelas quais são transportados elementos parasitarios provenientes de fócos distantes, tais como o intestino, cavidade bucal (amigdalas, dentes cariados, etc.).

Na nossa publicação, e para assinalar a gravidade dos casos, demos a seguinte estatistica levantada em 72 casos:

45 falecidos;
12 curados;
7 duvidosos;
8 sem evolução conhecida.

Mais felizes somos com os nossos casos, pois, ao que nos consta, apenas houve um falecimento.

## ACTINOMYCOSIS OF THE INTERNAL ORGANS OF THE FEMALE GENITAL APPARATUS

*Abstract*

*In this paper the author deals with four cases of actinomycosis of the internal organs of the femele genital apparatus.*

*In all cases no clinical suspicion of the diseases existed before surgical treatments were carried out, on account of chronic gynecological disturbances.*

*In one case lesions were present only in the Fallopian tubes, and in other cases the lesions were present both in tubes and ovaries.*

*The phytoparasites observed showed no club-like structures and varied greatly in their amount.*

*The type of lesion consisted always in a productive and exsudative reaction.*

*In this series, three patients recovered completely after operation, only one dying with the disease after surgical treatment.*

## BIBLIOGRAFIA

GUERREIRO DE FARIA e AMADEU FIALHO — 1937 — Actinomicose primitiva das trompas. *Anais Brasileiros de Ginecologia.* 8, n.º 1.

DANIEL ET MAVRODIN — 1934 — L'actinomycose génital de la femme. *Révue Française de Gynecologie.* 29, n.º 1.

CORNELL — 1939 — Actinomycosis of tubes and ovaries. *Am. J. of Pathology.* 10, n.º 4.

LISSA AND LEVINE — 1937 — Actinomycosis of the uterus and ovaries. *Archives of Pathology.* 23, n.º 1.

COUNSELLER AND HOERNER — 1934 — *Am. J. Surgery.* 26, 374.

JUNGHANS — 1934 — *Monatsch. f. Geburtsh. und Gynäkologie.* 98, 193.

GARDINER AND WELSH — 1935 — *Australian and New Zeland Surgery,* 4, 279.

HÜSSY — 1935 — *Zentralblatt f. Gynäk.* 59, 611.

FLORIANO DE ALMEIDA — *Micologia Medica.*

Nas memorias de CORNELL, MAVRODIN e nos nossos trabalhos, está toda a bibliografia sobre o assunto.

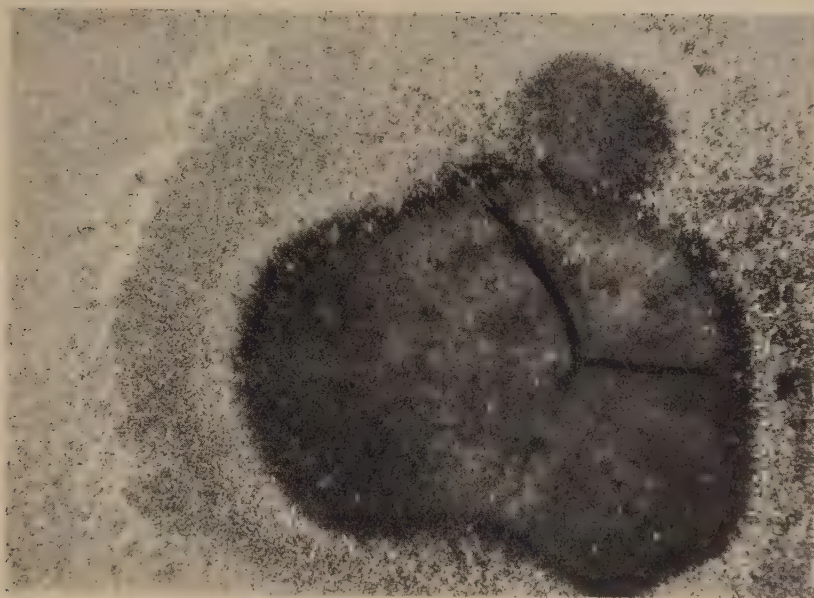


Fig. *A* — Grão parasitario. Conjunto. 1.ª observação.

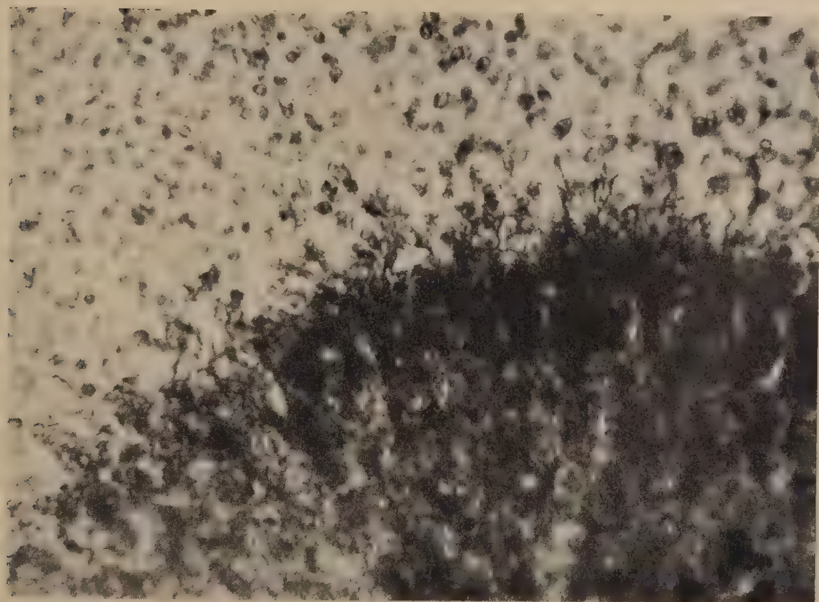


Fig. *B* — Grão parasitario. Detalhe. Vêm-se os filamentos micelianos irradiando na periferia. 1.ª observação.

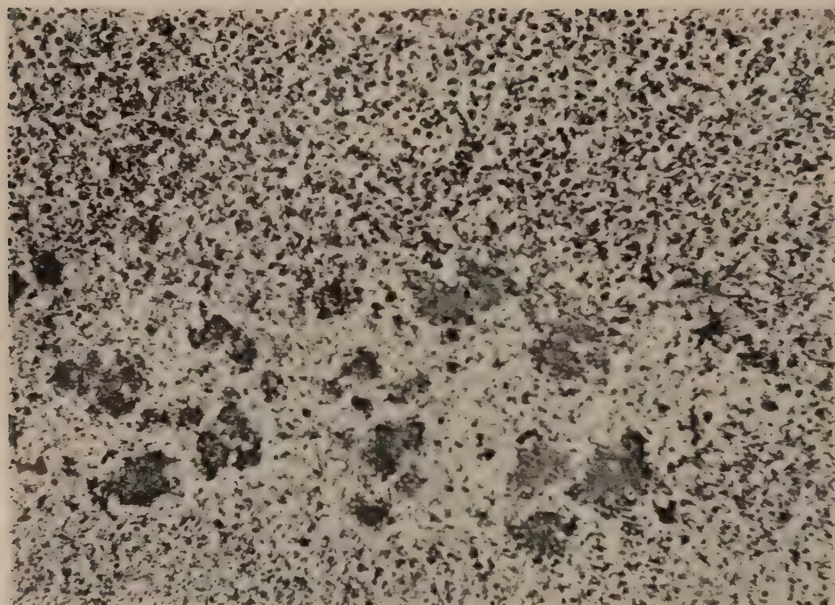


Fig. *C* — Massas micelianas constituindo formações nodulares pouco consistentes, no meio do exsudato. 2.ª observação.

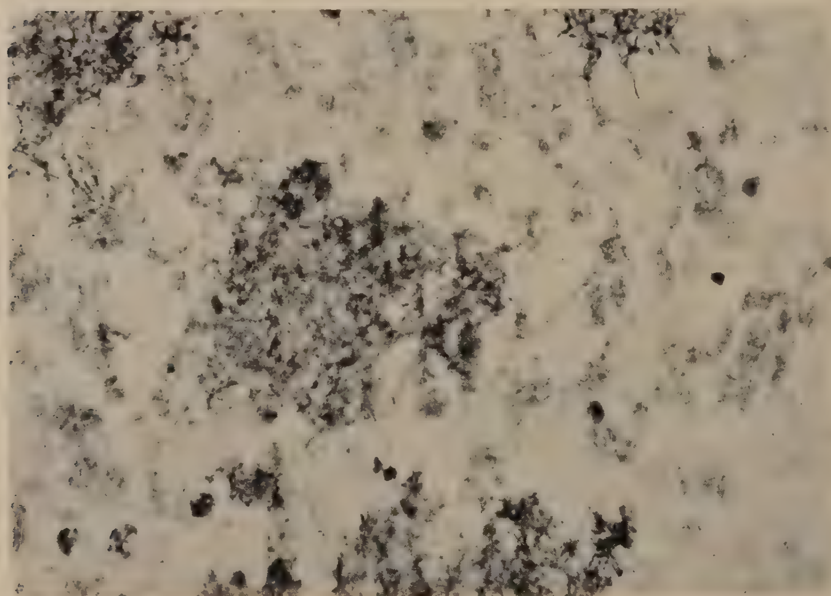


Fig. *D* — Finos filamentos micelianos corados pelo Gram. Apresentam tendencia á fragmentação granular. 2.ª observação.

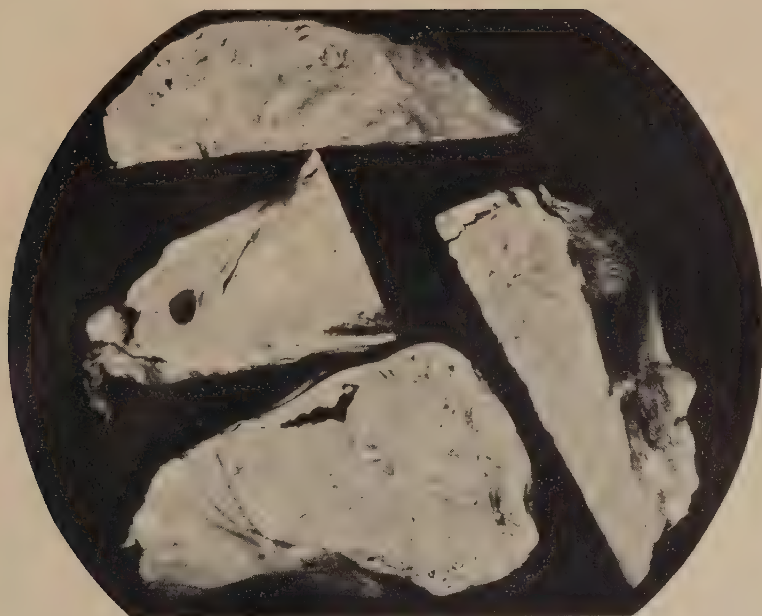


Fig. *E* — Fragmentos da trompa e ovario, vendo-se os pequenos e multiplos abcessos. 3.ª observação.

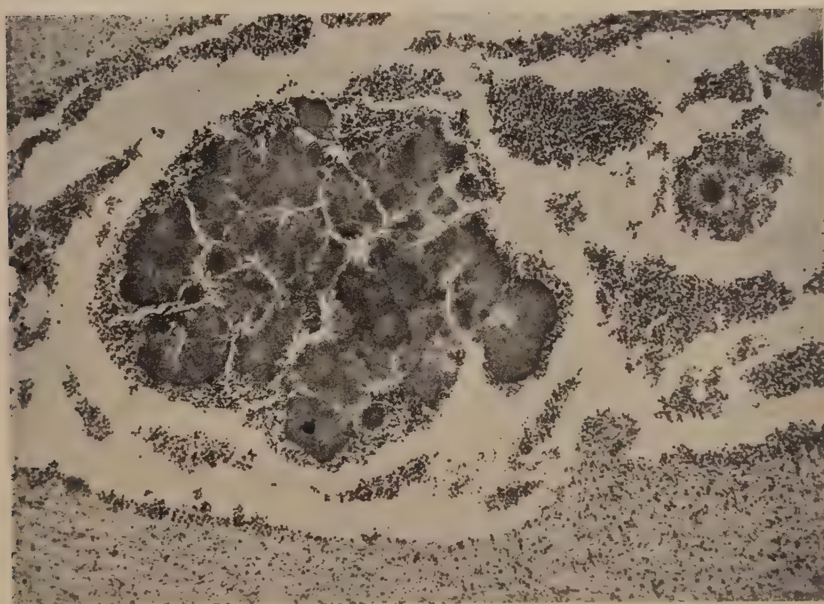


Fig. *F* — Grãos parasitarios. 3.ª observação.

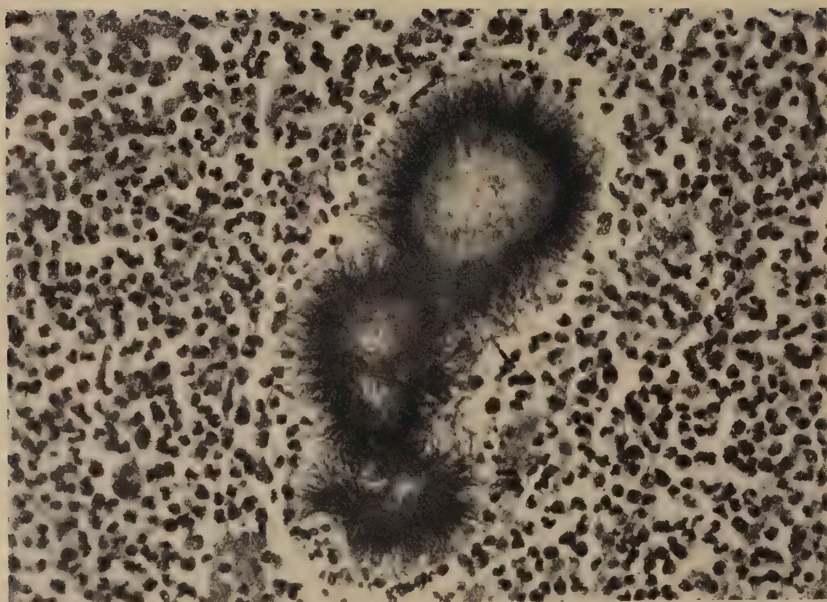


Fig. *G* — Grão parasitario, com tipico aspecto irradiado. 4.ª observação.

# GENÜGT DIE ZIEHL'SCHE FÄRBUNG ZUM NACHWEIS SÄUREFESTER BACILLEN ALLEN ANFORDERUNGEN?

VON

Martin Ficker, São Paulo

In aller Welt hat die Ziehl'sche Färbung zum Nachweis säurefester Bacillen in Laboratorien und bei praktischen Ärzten eine solche Verbreitung gefunden, dass man meinen müsste, sie entspräche allen Anforderungen. Sie besticht durch ihre Einfachheit, auch in bakteriologischen Dingen wenig geübte Ärzte und Laien vermögen sie auszuführen. Wichtige Eigenschaften sind besonders auch ihre relativ kurze Zeitdauer und die Haltbarkeit der bei ihr verwendeten Reagentien. Obwohl die Lösung von Ziehl-Neelsen an Färbekraft dem von Ehrlich und Koch benutzten Anilinwasserfuchsin unterlegen ist, fehlt sie infolge ihrer sonstigen Eigenschaften auf keinem bakteriologischen Arbeitstisch.

Freilich finden wir seit Bestehen der Methode ständig Versuche, sie zu modifizieren. Wir haben bereits über 100 verschiedene Methoden der Tuberkelbacillenfärbung, und die Literatur über die verschiedenen Methoden allein der Tuberkelbacillenfärbung weist weit über 1000 Nummern auf.

Die Modifizierungsversuche betreffen jede einzelne Phase der Methode: Farbe, Entfärbung, Gegenfarbe, Zeitdauer der einzelnen Manipulationen; viele wollen auch der Bequemlichkeit dienen.

Stellt man als suprema lex die Genauigkeit der Methoden auf, so ist heute noch absolut keine Übereinstimmung erzielt. Auch in dieser Beziehung hat die Ziehl-Methode allen Anstürmen getrotzt und sie wird auch dort gehandhabt, wo es nicht nur auf schnelle und bequeme Erledigung von Massenuntersuchungen ankommt, sondern wo man es nötig hätte, auch auf den wichtigen Nachweis ganz geringer Mengen, ja vereinzelter Tuberkelbacillen das Augenmerk zu richten, also um Initialfälle aufzudecken, um die Behandlung zu kontrollieren, um Bacillenträger zu finden, um Punctate, Mageninhalt, Larynxabstriche zu untersuchen u. s. f. - hier darf die Bequemlichkeit keine Rolle spielen, und einzig und allein muss das Quantitative den Ausschlag geben d. h. diejenige Methode ist gerade gut genug, die die höchste Genauigkeit besitzt.

Will man die verschiedenen Färbemethoden auf ihre quantitative Sufficienz vergleichend prüfen, no erheben sich eine Reihe von Schwierigkeiten. Mit Hinblick auf den praktischen Zweck wurde in erster Linie tuberkulöses *Sputum* verwendet. Nun ist es aber bekannt,

wie ungleich dick und dünn die Ausstriche auf dem Glase ausfallen, selbst wenn man gleiche Quantität benutzt, und ferner, wie ungleichmässig im Sputum die Tuberkelbacillen verteilt sind: man denke an die beigemengten Gewebsbröckel, an Kaverneninhalt mit vielen Bacillen, andererseits an die beigemengten Bestandteile, in denen wenig oder gar keine Tuberkelbacillen zu sein pflegen wie desquamierte Epithelien, mehr oder weniger zäher Schleim von katarrhalischen Stellen, Speichelbeimengungen u. s. f. Es sind infolgedessen vergleichende Zählungen an solchen Präparaten nur von geringem Wert. Man muss vielmehr darauf ausgehen, das Sputum zu homogenisieren, sodass die Einheit Sputum die gleiche Menge Tuberkelbacillen enthält.

Eine andere Schwierigkeit betrifft die Art der Fixierung. Bei vergleichenden Ausstrichen können bei den nachfolgenden Manipulationen ungenügend fixierte Bacillen abgeschwemmt werden. Es ist daher durchaus nötig, bei den verschiedenen Proceduren peinlich gleichmässig vorzugehen, Erhitzen, Kochen, Spülen so vorsichtig wie möglich auszuführen, beim Trocknen die direkte Berührung mit Fliesspapier zu vermeiden u. s. f. Man wird eventuell, wenn trotz dieser Vorsichtsmassnahmen Verdacht auf Ablösungen besteht, stärker fixieren müssen oder durch Serumbeimischung ein besseres Ankleben bewerkstelligen oder mit Glycerineiweiss das Glas vorbereiten. Das letztere ist ganz besonders bei Verwendung von Reinkulturen erforderlich.

In Anbetracht der Schwierigkeit, vergleichende Färbungen von Tuberkelbacillen zu beurteilen, habe ich mich bisher sehr skeptisch verhalten, wenn neue Färbemethoden auftauchten. Aus eigener Beobachtung heraus erschienen mir aber die Methoden, die sich des Natriumsulfits bedienen, besonders bemerkenswert, ich habe sie in meinem Beitrag zum Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann, III. Auflage Bd IX, Methoden der Bakterienfärbung, p. 752 beschrieben, z. B. die Methoden von Konrich und Osol. — Trotzdem bin ich bei der gewohnten Ziehl-Methode geblieben.

Als ich nun eines Tages die Reinkultur eines säurefesten Stammes meiner Sammlung nach Ziehl färbte und nur 60 % der Bacillen rote Färbung aufwiesen gegen 40 % blaugefärbter Bacillen, wiederholte ich den Versuch und führte eine Parallelfärbung nach Osol aus.

Versuch 1. — Cultur 1225. Alter: 21 Stunden bei 37° auf 4 % Glycerinagar. 1 Nadelspitze Kultur in 1cc sterilem Wasser gleichmässig verrieben. Davon 2 grosse Ösen auf Objektträger (mit Glycerineiweiss) ausgestrichen, sodass die Ausstrichfläche 2 x 2 cm. betrug. Objektträger *a* nach Ziehl, Objektträger *b* nach Osol gefärbt. Resultat: | *a.* Ziehl 30-40 % Bacillen blau. 60-70 % rot.
| *b.* Osol 100 % rot!

Danach nahm ich eine 3-4 Tage alte Kultur desselben Stammes. Praeparation wie bei 1.

Versuch 2. | a. Ziehl 80-90 % blau
| b. Osol 100 % rot!

Dies verblüffende Resultat war der Anlass, diesen Färbemethoden weiter nachzugehen. Ausser der Ziehl- und Osolmethode, die neuerdings von Alfred Johannsen empfohlen wird, verwendete ich die Methode von KONRICH, aus der die Osolmethode hervorgegangen ist, sowie die durch ihre Einfachheit ausgezeichnete Methode von A. POOMAN.

## VORSCHRIFTEN DER VERWENDETEN METHODEN

### I. ZIEHL

1. Färben mit Karbolfuchsin Ziehl-Neelsen unter Erhitzen bis gerade Blasen springen, 3 Minuten stehen lassen. 2. Farbe abgiessen. 3. 15 Sekunden in 1 % HCl-Alcohol entfärben. Eventuell wiederholen. 4. Abspülen mit Leitungswasser. 5. Nachfärben einige Sekunden mit Methylenblaulösung (Löfflers Methylenblau 10 Teile, aqua dest. 90 Teile). 6. Abspülen mit Wasser.

### II. KONRICH

1. Färben 2 Minuten mit heissem koncentrierten Karbolfuchsin. 2. Kräftig mit Wasser abspülen. 3. Entfärben mit 10% wässriger Natriumsulfitlösung bis zur völligen Entfärbung. Die Sulfitlösung soll alle 3-4 Tage frisch hergestellt werden. 4. Abspülen mit Wasser. 5. Nachfärben ¼ — ½ Minute mit wässriger Malachitgrünlösung (gesättigte wässrige Malachitgrünlösung 5,0 + 100,0 aqua dest.) 6. Wasserspülen.

### III. OSOL

1. Färben bis zur Dampfbildung mit koncentriertem Karbolfuchsin, dann 2 ½ Minuten Kochen. 2. Abspülen mit Wasser. 3. Entfärben mit 10 % iger Schwefelsäure 10-15 Sekunden; eventuell wiederholen. 4. Trocknen mit Fliesspapier. 5. Nachentfärben mit 5 Teilen 10 % igem Natriumsulfit + 1 Teil Alcohol absolutus, bis Farbe entschwunden. 6. Abspülen mit Wasser.

### IV. POOMAN

1. Färben mit koncentriertem Karbolfuchsin kalt 1 Minute. 2. Leicht abspülen mit Wasser. 3. Nachfärben in 1% Methylenblau-Alcohol 20 Sekunden. 4. Wasserspülen. 5. Über Flamme trocknen. Ist das Praeparat zu rot, nochmals 5-10 Sekunden nachfärben.

## VERSUCHE MIT REINKULTUREN

Die Versuche wurden zunächst mit der vorgenannten Reinkultur 1225 ausgeführt, denn sie bot ein gutes Testobjekt für die Prüfung auf Säurefestigkeit.

Geht man von festen Kulturen aus, so ist es notwendig, für die Ausstriche eine gleichmässige Suspension zu verwenden, gleichgiltig, ob man das Material von einer oder mehreren Stellen wegnimmt, wenn man nur gut mischt, damit die einzelnen Praeparate mit einander vergleichbar sind und dasselbe Kulturmaterial enthalten. Das ist aber nicht der Fall, wenn man die Kultur als etwas morphologisch Einheitliches ansieht und beispielsweise Präparat *a* mit Material von einer Kulturstelle *a* und Praeparat *b* mit Material von einer anderen Kulturstelle *b* u. s. f. versieht. Gerade in Kulturen mit labilen Säurefesten lässt sich feststellen, dass in ein und derselben Kultur die Bacillen sich morphologisch und tinctoriell recht verschieden verhalten können, je nachdem man von den oberen mehr dem Trocknen ausgesetzten dünneren Partien oder von den unteren feuchten, in dicker Nährbodenschicht gewachsenen oder vom Rande oder der Mitte entnimmt. Diese Tatsache ist jedem geläufig der Prüfungen auf Sporenbildung, Beweglichkeit, Geisseln vornimmt. Mögen es nun die gewöhnlichen mit Wattestopfen verschlossenen Röhrchen oder die Helmröhrchen nach Gayon-Dupetit oder die mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossenen Röhrchen sein, dessen Durchbohrung ein mit Watte versehenes kurzes Glasröhrchen trägt — in allen diesen Kulturen stehen die verschiedenen Stellen unter recht verschiedenen Trocknungs- und Ernährungsbedingungen, was die Morphologie, das Absterben, die Auflösung und damit die Färbbarkeit beeinflusst. — Man weicht diesen Unsicherheiten aus, indem man sich eben für vergleichende Färbungen homogene Suspensionen herstellt.

Um recht deutliche Ausschläge zu bekommen, verwendete ich nicht nur die von der Originalkultur stammenden in gerader Linie immer auf Glycerinagar weiter gezüchteten Kulturen, sondern für einige Versuche auch Seitenlinien des Stammes 1225, die sich durch Fortzüchtung auf bestimmten Nährböden, über die ich später berichten will, besonders schwach oder stark säurefest zeigten. Auch hielt ich es für angebracht, den auf Säurefestigkeit zu prüfenden Bacillen sicher nicht säurefeste Kokken in einigen Versuchen beizumischen, ich nahm von einer eintägigen Kultur eines Staphylococcus aus Luft 1 oder 2 Ösen, mischte sie der Suspension des zu prüfenden Säurefesten bei und machte von dieser Mischung die Ausstriche.

Versuche mit Reinkulturen

| Nummer des Versuchs | Kultur | Alter | Ziehl | Osol | Konrich | Pooman |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | % | % | % | % |
| 3 | 1225, Or. | 4 Tage | 90 blau | 80-90 rot | — | — |
| 4 | » » | 4 » | 100 blau | 100 rot | — | — |
| 5 | » » | 3 Wochen | 100 blau | 100 zart rot | — | — |
| 6 | » Linie 3 | 2 Tage | 40-50 blau | 70 rot | — | — |
| 7 | » » 4 | 1 Tag | 25 blau | 90 rot | 100 rot | 90 rot |
| 8 | » » III | 1 » | 90 rot | 100 rot | 100 rot | 100 rot |
| 9 | » Or. | 8 Tage | 100 blau | 50 blau | 100 rot | 100 rot |
| 10 | » » | 2 » | 50-60 blau | 100 rot | 100 rot | 100 rot |
| 11 | » » | 2 » | 50-60 blau | 100 rot | 100 rot | 80-90 rot |
| 12 | » Linie 4 | 10 Stunden | 100 blau | 10-20 blau | 50 blau | 100 rot |
| 13 | » Orig. | 20 » | 50 blau | 80 rot | 100 rot | 70-80 rot |
| 14 | » » | 3 Tage | 70-80 rot | 90 rot | 100 rot | 100 rot |
| 15 | » » | 5 » | 10 rot | 100 rot | 90 rot | 100 rot |

Den Versuchen mit der Kultur 1225 füge ich noch einige mit anderen säurefesten Reinkulturen an, ich nahm den von mir aus einem Leprom gezüchteten Stamm $L_3$, der, wie ich mehrfach beschrieb, leicht in den Stamm $L_3$ Trocken und $L_3$ Feucht dissociiert. $L_3$M bedeutet die Kultur vor der Dissociation durch die Plattenkultur, ist also eine Mischung von $L_3$ Trocken und $L_3$ Feucht.

| Nummer des Versuchs | Kultur | Alter | Ziehl | Osol |
|---|---|---|---|---|
| 16 | $L_3$Tro | 6 Tage | 95 % blau | 90 % rot |
| 17 | $L_3$F | 2 » | 90 % rot | 90 % rot |
| 18 | $L_3$M | 4 » | 50 % rot | 80 % rot |

Die angeführten Versuche bedürfen keiner ins Einzelne gehenden Erläuterung, sie zeigen bei den verwendeten säurefesten Kulturen die relativ geringe Leistungsfähigkeit der Ziehlmethode. Hierbei spielt das Alter eine bedeutende Rolle: während z. B. in Versuch 9 die Ziehl-Methode bei der 8 tägigen Kultur völlig versagt, da 100 % der Bacillen die Gegenfarbe annehmen, zeigen die Methoden von Konrich und Pooman alle Bacillen säurefest, Osol hält sich hier in der Mitte. Bei den 2 tägigen Kulturen sind Osol und Konrich sehr sicher, Pooman reicht nicht ganz heran und Ziehl zeigt nur 40-50 % rot. Besonders ungünstig ist Ziehl für sehr junge und für alte Kulturen.

VERSUCHE MIT TUBERKULÖSEM SPUTUM

Wie schon erwähnt müssen bei der Praeparierung für vergleichend quantitative Sputumfärbungen gleichmässige Ausstriche erstrebt werden, was nur durch vorausgehendes Homogenisieren möglich ist. Dabei soll die Verwendung von Chemikalien vermieden werden, um die nachfolgende Färbung nicht zu beeinflussen. Auch bedingen manche Homogenisierungsmethoden ein ungenügendes Haften des homogenisierten Sputums auf dem Objektträger. Es ist nun wenig bekannt, dass man Sputum gut homogenisieren kann, wenn man es in einem fest verschlossenen Pulverglas während 5-10 Minuten in einem Wasserbad allmählich auf 65-75° unter häufigem energischen Schütteln erwärmt. Damit verteilen sich die in dem Sputum befindlichen Tuberkelbacillen gut, ohne von Chemikalien beeinflusst zu werden. Beschickt man hiermit mit Glycerineiweiss vorbereitete Objektträger, so bekommt man sehr gleichmässige Ausstriche, die nach Flammenfixation gut haften. Für quantitativ vergleichbare Färbungen ist es noch nötig, gleiche Mengen (z. B. 3 grosse Ösen) auf die gleiche Flächengrösse auszustreichen. Man legt hierzu den Objektträger auf ein vorgezeichnetes Quadrat z. B. von 2 x 2 cm. — Die Zählungen nahm ich mit Öl-Imersion und durch Ocular 1 Leitz vor, es wurden von jedem Praeparat gleichmässig 100 Gesichtsfelder ausgezählt.

Vergleichende Färbungen von tuberkulösem Sputum

| Versuch Nr. | In 100 Gesichtsfeldern Tuberkelbacillen | nach Ziehl | nach Osol | nach Konrich | nach Pooman |
|---|---|---|---|---|---|
| 19 | | 55 | 266 | 139 | 54 |
| 20 | | 191 | 749 | 510 | 166 |
| 21 | | 319 | 443 | 626 | 280 |
| 22 | | 161 | 394 | 241 | 160 |
| 23 | | 158 | 248 | 176 | 104 |
| 24 | | 161 | 408 | 376 | 51 |
| 25 | | 46 | 390 | 410 | 240 |
| | | 1.091 | 2.898 | 2.478 | 1.055 |
| 26 | | 486 | 894 | 758 | — |
| 27 | | 542 | 768 | 528 | — |
| 28 | | 37 | 55 | 45 | — |
| 29 | | 38 | 34 | 98 | — |
| 30 | | 212 | 352 | 408 | — |
| | | 2.406 | 5.001 | 4.315 | — |

Vergleicht man die ersten sieben Sputum-Versuche, so ist die quantitative Ausbeute an Tuberkelbacillen bei Ziehl (1091) und Pooman (1055) ungefähr gleich, beide werden von Konrich (2478) und Osol (2898) weit übertroffen. Ich habe dann Pooman's Methode, die für die Reinkulturen (s. o.) recht gute Resultate gab, aber für Sputumfärbung weniger geeignet ist, nicht weiter geprüft und füge noch 5 Versuche mit Sputum nach Ziehl, Osol, Konrich an, die die voraufgehenden Resultate bestätigen: die Summe ergibt für Ziehl 2406, Osol 5001 und Konrich 4315 Tuberkelbacillen.

Man muss aber die Methoden auch nach der qualitativen Seite hin beurteilen: die Bacillen sollen nicht nur in möglichst hoher Zahl erfasst werden, sondern sollen dem Auge auch in typischer Form erkennbar sein, auch langes Suchen darf nicht ermüden. In dieser Hinsicht hat das Verfahren von KONRICH hohe Vorteile, die leuchtend rot gefärbten Bacillen heben sich überaus deutlich vom zartgrünen Untergrunde ab. Gewebe, Eiterkörperchen, Epithelzellen lassen auch ganz vereinzelte Säurfeste sehr scharf hervortreten, auch wenn Begleitbakterien in grössten Mengen vorhanden sind. Da nun aber OSOL bei der Sputumfärbung numerisch an der Spitze steht, so kann man den Vorteil des zartgrünen Kontrastes auch hier sich nutzbar machen, indem man mit einer wässrigen Malachitgrünlösung 1:500 einige Sekunden nachfärbt. — Aufgefallen ist mir bei Osol noch in Tuberkelbacillenreichen Sputis, dass sich öfters sehr kurze säurefeste Formen beobachten liesen, die nur etwa den dritten oder vierten Teil der Länge des typischen Tuberkelbacillus besassen und die bei den Vergleichsmethoden nicht zur Wahrnehmung kamen.

Es ist erforderlich, derartige vergleichende Untersuchungen auf solche tuberkulöse Materialien auszudehnen, in denen man bisher die spezifischen Bacillen nicht oder nur in sehr geringen Mengen fand. Es ist meine Überzeugung, dass die bakteriologische Technik uns noch solche färberische Darstellungen der Tuberkelbacillen in die Hand geben wird, die dem Kultur- und Tierversuch an Wert gleichkommen. Ein Zeitgewinn bedeutet doch bei der Tuberkulose ungeheuer viel. Deshalb sollte doch diesem Problem mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden. Die neueren Versuche am Fluorescenzmikroskop zeigen ja auch das Bestreben, den Nachweis säurefester Bacillen zu verfeinern. Freilich sind die bisherigen vergleichenden Versuche nicht völlig überzeugend, weil man eben die unzulängliche Ziehlmethode als Massstab nahm und noch dazu in einer solchen Modifikation, dass mindestens junge und

sehr alte Individuen der Entfärbung anheimgefallen sein dürften, da für die Sputumausstriche ein 3 % iger Salzsäure-Alkohol 1 Minute lang angewendet wurde, was entschieden zu teilweiser Entfärbung führt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ziehl'sche Methode zum Nachweis säurefester Bacillen wird bei vergleichenden quantitativen Untersuchungen an Reinkulturen säurefester Bacillen und an tuberkulösem Sputum in der vorliegenden Arbeit als unzureichend befunden.

Sie wird an Exaktheit bei weitem übertroffen von den Methoden Osol und Konrich.

Poomans Methode bewährte sich bei Reinkulturen, nicht aber bei tuberkulösem Sputum.

Wer einzig und allein die Ziehl-Methode zum Nachweis von Tuberkelbacillen benutzt, weist zu wenig Tuberkelbacillen nach und bekommt zuviel negative Resultate, es müssen dann noch weitere Methoden herangezogen werden, wofür die Methoden Osol und Konrich empfehlenswert sind, erstere mit anschliessender Gegenfärbung mittels schwacher Malachitgrünlösung.

Es bedarf der Prüfung, ob die Fluorescenzmethode zum Nachweis von Tuberkelbacillen wirklich die überragende Rolle spielt, die ihr zugeschrieben wird, denn sie wurde bisher nur an dem Masstab der unzureichenden Ziehl-Methode gemessen.

Da auch die Methoden, die dem Verfasser die grössten Ausbeuten an Tuberkelbacillen gaben, mitunter Ungleichmässigkeiten aufwiesen, so bedarf das Problem des exaktesten mikroskopischen Nachweises von Tuberkelbacillen noch weiterer Bearbeitung.

Abgeschlossen am 31.VIII.1939

-o-

# CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS MEMBRACIDEOS NEOTRÓPICOS (III)

POR

J. P. da Fonseca

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 4 figuras no texto

No presente trabalho estudamos o gênero *Centronodus* FUNK., 1930, que contava duas espécies, uma de Costa Rica e outra de Pernambuco. Com a nova espécie de S. Paulo, agora descrita por nós, eleva-se ao número de tres os componentes do gênero.

## Gênero *Centronodus* FUNKHOUSER

*Centronodus* FUNKHOUSER, 1930, Journal of the New York Entomological Society, vol. XXXVIII, pp. 405-406, 2 figs.

Genótipo: *Centronodus denticulus* FUNKHOUSER, 1930.

*Caracteres do gênero:* — Pronoto com fortes cornos supra-umerais e com um grande nódulo no centro do processo posterior; escutelo exposto em ambos os lados do processo posterior; processo posterior extendendo-se para os ângulos dos tégmina; clavos acuminados; nervulação da área terminal dos tégmina reticulada e irregular, formando numerosas células. Asas com quatro células apicais. Cabeça subquadrada, mais larga do que longa. Tarsos normais.

*Chave para as espécies do gênero Centronodus* FUNK.

1 (4) Dorso do pronoto com lóbulo espiniforme em frente ao lóbulo central.
2 (3) Lóbulo central simplesmente elevado, não dirigido para frente . . . . *C. denticulus*
3 (2) Lóbulo central elevado e dirigido para frente . . *C. rochalimai, n. sp.*
4 (1) Dorso do pronoto desprovido de lóbulo espiniforme em frente ao lóbulo central; lóbulo central arredondado . . . . . . . . . . *C. flavus*

## *Centronodus denticulus* FUNKHOUSER

Fig. 1

♂. Grande, castanho, densamente puncturado, esparsamente pubescente; um pequeno dente na linha mediana justamente atraz dos supra-umerais e em frente ao nódulo central; supra-umerais robustos, em forma de pirâmide, tricarenados, extendendo-se para fora e para cima. Tégmina coriáceos e opacos.

Cabeça subquadrada, mais larga que longa, grossamente esculturada, densamente puncturada, esparsamente pubescente, com longos pêlos fulvos; base arqueada; ocelos grandes, côr de âmbar, com margens brancas, ligeiramente elevados, equidistantes entre si e os olhos e situados mais ou menos em uma linha puxada entre os centros dos olhos; genas foliáceas e angulosas; clípeo duas veses mais longo do que largo, extendendo-se por um terço do seu comprimento abaixo das margens inferiores das genas.

Pronoto áspero, castanho, manchado de preto e amarelo, densamente puncturado, esparsamente pubescente; metopídeo direito, mais largo do que alto, com uma depressão lisa de cada lado, na base; ângulos umerais grandes, triangulares, proeminentes, extendendo-se lateralmente até além dos olhos; carena mediana forte, percurrente; cornos supra-umerais fortes, desenvolvidos, mais ou menos do comprimento da distância entre suas bases, em forma de pirâmides tricarenadas, extendendo-se para fora e para cima com as extremidades curvadas bruscamente para fora; um dente distinto na linha mediana do dorso, justamente atraz dos supra-umerais e em frente ao nódulo central; processo posterior robusto com um nódulo forte e elevado na base, extremidades tectiformes e extendendo-se para os ângulos internos dos tégmina, com uma faixa amarela antes da ponta.

Escutelo ligeiramente exposto de cada lado; pintado de castanho e amarelo; puncturado, pubescente.

Tégmina pardos, irregularmente manchados de amarelo e preto, coriáceos, opacos, veias grossas, área apical dividida em várias células irregulares. Extremidade obtusa.

Asas com quatro células apicais.

Partes ventrais do corpo pardas; fêmures e tíbias com faixas pardas e amarelas; tarsos ferruginosos.

Comprimento da fronte da cabeça até a extremidade dos tégminas, 9 mm.; largura entre as extremidades dos supra-umerais, 4'9 mm.

Localidade: Costa Rica.

Descrito de um único espécimen, segundo o autor.

Tipo na coleção de W. D. FUNKHOUSER.

## *Centronodus rochalimai*, n. sp.

Figs. 2 e 3

♀. Grande, coloração fundamental verde-escura, com matizes castanho-claros; tegumento denso e grossamente puncturado e levemente pubescente.

Cabeça tão longa quanto larga, verde-escura, com as extremidades apicais das genas pretas; toda a superfície da cabeça é ondulada, grossa e dispersamente puncturada, provida de pubescência fina, dispersa e flavescente; contornos marginais francamente ondulados; margens laterais ligeiramente convexas, sinuadas, com pronunciada entumescência na região supra-ocelar; região frontal, ao longo da sutura mediana, deprimida, lateralmente entumescida sôbre os ocelos. Ocelos pequenos, pardacentos, equidistantes entre si e as margens laterais e basal da cabeça. Expansões genais quasi tão largas quanto longas, deprimidas no centro, com as margens laterais ligeiramente marginadas, sinuadas e terminadas em ponta arredondada. Clípeo oblongo, convexo, ultrapassando em comprimento as extremidades das genas, longitudinalmente marcado por uma carena espessa, irregular, glabra e lusidia. Olhos oblongos, com as córneas pardacentas.




Fig. 1 — *Centronodus denticulus* FUNKHOUSER. Fig. 4 — *Centronodus flavus* FUNKHOUSER. (seg. FUNKH.)

Pronoto áspero, verde-escuro, levemente matizado de castanho-claro, grossamente puncturado e finamente pubescente. Metopídeo tão largo quanto alto, de perfil com a linha de contôrno arredondada e levemente inclinada para traz; regiões laterais, junto aos ângulos umerais, deprimidas. Calosidade superocular bem pronunciada, em forma de meia lua, voltada para a parte anterior. Ângulos umerais ligeiramente salientes, arredondados e marginados. Carena mediana saliente, elevada, glabra e lusidia sôbre o terço anterior do pronoto. Cornos supra-umerais desenvolvidos, altos, divergentes, extendendo-se para fora, tricarenados, na base tão largos quanto longos, ligeiramente curvados para baixo e gradativamente afilados para o ápice, com a extremidade distal curvada para baixo; face superior deprimida, inferior convexa, abaulada em sentido transversal; região lateral, entre o ápice e a base dos cornos, percorrida por uma carena cortante. Dorso mediano do pronoto provido de uma entumescência bilobada, fortemente deprimida para a parte superior; lóbulo anterior pequeno, implantado atraz dos cornos umerais, curto, erecto, espiniforme; lóbulo posterior grande, alongado, mais longo do que alto, de perfil francamente inclinado para a parte anterior, formando-se, entre os lóbulos, uma depressão larga e profunda; visto de frente, apresenta-se alongado na base, fortemente deprimido para a parte superior, que se apresenta cortante; margens laterais levemente marginadas, fortemente emarginadas entre os lóbulos pronotais, deixando aparecer uma pequena parte do escutelo; processo posterior do pronoto afilado para a extremidade distal e terminado em ponta aguda, não ultrapassando a extremidade do abdômen. Escutelo, na parte exposta, matizado de preto e amarelo.

Tégmina opacos, na parte basal densa e finamente puncturados, na parte apical ligeiramente translúcidos; nervulação saliente; área apical provida de numerosas pequenas células discoidais.

Asas cinéreas, hialinas, com as nervuras castanho-escuras; quatro células apicais.

Partes inferiores do corpo pardo-escuras, acastanhadas.

Fêmures com aneis flavescentes; tarsos dos primeiro e segundo pares de patas, pretos.

Comprimento total, da base da cabeça à extremidade dos tégmina, 11 mm.; do pronoto, 1 mm.; largura do pronoto, entre os ângulos umerais, 4 mm.; expansão entre as extremidades dos cornos supra-umerais, 7 mm.

Cótipos: 3 fêmeas, um espécimen na coleção do Departamento de Zoologia, outro na coleção do Instituto Biologico e outro na coleção do autor.

*Habitat:* Brasil — São Paulo (Parque Jabaquara) e Campos do Jordão.

Col. por JOHN LANE e JACINTO GUÉRIN.




Figs. 2 e 3 — *Centronodus rochalimai*, n. sp.

A presente espécie é proxima de *Centronodus denticulus* FUNK. e de *Centronodus flavus* FUNK. Difere da primeira principalmente por apresentar os lóbulos anteriores e posteriores sôbre o pronoto consideravelmente mais desenvolvidos, sendo o segundo lóbulo distintamente voltado e curvo para a região anterior, e da segunda por faltar nesta o lóbulo espiniforme, anterior.

Dedicamos esta espécie ao Professor H. DA ROCHA LIMA, Diretor do Instituto Biologico, de São Paulo.

## *Centronodus flavus* FUNKHOUSER

Fig. 4

Grande, amarelo, puncturado, não pubescente; supra-umerais desenvolvidos, fortes, projetando-se para fora e muito ligeiramente para cima; lóbulo do processo posterior reto na margem frontal. Lóbulo espiniforme diante do segundo lóbulo ausente. Terço basal dos tégmina opaco e coriáceo, os dois terços apicais hialinos, enrugados, nervulação da área apical reticulada; superfície inferior e pastas amarelas.

Cabeça subquadrada, mais larga do que alta, finamente puncturada, muito esparsamente pubescente, grosseiramente esculturada; base arqueada, olhos grandes, cinzentos; ocelos grandes, um pouco elevados, côr de âmbar, pouco mais aproximados entre si do que dos olhos e situados um pouco abaixo da linha traçada entre os centros dos olhos; genas foliáceas e truncadas; clípeo tão longo quão largo, bordo inferior atingindo a linha das genas.

Pronoto amarelo, manchado de castanho, finamente puncturado, muito esparsamente pubescente; supra-umerais ásperos, robustos, subcórnicos, extendendo-se para fora e muito ligeiramente para cima, mais ou menos da metade do comprimento da distância entre suas bases, extremidades agudas; ângulos umerais pequenos, não proeminentes; metopídeo arqueado, duas vezes mais largo do que alto; carena mediana ligeiramente amarelada e fortemente percurrente; processo posterior robusto, extendendo-se até os ângulos internos dos tégmina, elevação perpendicular na frente e arqueada atraz com uma carena de cada lado. Nenhum dente em frente ao nódulo central. Escutelo ligeiramente exposto de cada lado do processo posterior, manchado de amarelo e pardo.

Tégmina opacos, puncturados e coriáceos no terço basal, translúcidos nos dois terços apicais; veias robustas; nervulação da área apical irregular e dividida em numerosas pequenas células; extremidades arredondadas.

Asas com quatro áreas apicais.

Superfície inferior e patas, uniformemente amarelas.

Comprimento, desde a fronte da cabeça até a extremidade dos tégmina, 8,5 mm; largura entre as extremidades dos supra-umerais, 4,5 mm.

Tipo: fêmea.

Localidade: Pernambuco (Brasil).

Descrito de dois espécimens do mesmo sexo e da mesma localidade, segundo o autor.

Tipo e parátipo na coleção de W. D. FUNKHOUSER.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE NEOTROPICAL MEMBRACIDAE (III)

*Abstract*

*The present paper deals with the genus Centronodus (Homoptera-Membracidae), describing C. rochalimai, n. sp., from São Paulo.*



# QUOCIENTE DE OXIDAÇÃO DO ACIDO LÁTICO NO ENCEFALO DE AVES NORMAIS E EM AVITAMINOSE $B_1$

POR

P. E. Galvão e J. Pereira

Do Instituto Biologico de S. Paulo

No decurso de trabalhos sobre avitaminose $B_1$ verificámos grave perturbação da oxidação do acido lático no sistema nervoso central, condicionando o aparecimento de sintomas nitidos (1). Era pois natural investigar neste tecido o quociente de oxidação do acido lático, nessas condições, o que até agora não foi realisado.

Mesmo determinações no sistema nervoso normal são raras, executadas com técnicas que deixam a desejar e feitas exclusivamente em cerebros de mamiferos.

A falta de dados sobre o assunto é tanto mais de lamentar quanto a importancia da determinação deste quociente para o conhecimento do metabolismo intermediario dos hídratos de carbono, num determinado órgão, é sobejamente demonstrado pelos trabalhos classicos de WARBURG e MEYERHOF (2 e 3).

Daí o nosso interesse em determinar com técnica adequada este quociente, tanto no cerebro quanto no ístmo do encéfalo de animais normais e em beriberi.

## TÉCNICA

Para determinação do quociente de oxidação, isto é: $\frac{\text{acido lático consumido}}{\text{acido lático oxidado}}$ procedemos do seguinte modo: mediamos o consumo de $0_2$ pela técnica manometrica de WARBURG, em duas suspensões do mesmo tecido sendo uma delas adicionada de uma quantidade exatamente conhecida de latato de litio, variando entre 2 e 5 mgrs. Algumas determinações foram feitas adicionando-se a uma terceira porção do tecido não só latato, mas ainda vitamina $B_1$.

A diferença de consumo de oxigenio ($0_2$ — Extra) entre o tecido adicionado de latato ($0_2$ — latato) e o tecido sem adição ($0_2$ — Basal), multiplicada pelo fator 1,34 nos fornece a quantidade de acido lático oxidado.

Por outro lado, a determinação do acido lático no conteúdo das cubas de respiração no fim desta experiencia, nos permitia determinar as quantidades do acido lático adicionado que havia sido consumida, descontadas as quantidades pré-formadas nos tecidos. Usámos a técnica de FRIEDMANN, COTONIO e SCHAEFFER, tornada mais precisa pela nossa modificação (4).

E' conveniente acentuar que fizémos variar as quantidades de tecido por cc. de liquido nutritivo desde 300 mgrs. até 60 mgrs.

Na quasi totalidade dos casos o tecido era suspenso em 1 cc. de liquido nutritivo, mas em alguns casos empregamos 2 cc. de liquido. Observámos que os resultados obtidos são independentes da concentração da suspensão de tecidos no liquido.

Para obter a maxima homogeneidade da suspensão de tecido no liquido de Warburg empregámos nas experiencias a serem aqui relatadas, o tecido submetido a desintegração perfeita num gral. Tambem empregámos, em experiencias a serem futuramente relatadas, tecido finamente picado, o que condiciona certas diferenças de resultados que serão então postas em evidência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CEREBRO E ÍSTMO DE ENCÉFALO DE GALINHAS NORMAIS

Os resultados que obtivemos se acham expressos nas tabelas.

Os quocientes de oxidação estabelecidos por MEYERHOF para fatias de musculo de mamífero, estão compreendidos entre 3 e 6, tendo

TABELA 1

Cerebro de galinha normal (moído em gral)

Respiração e quociente de oxidação do acido lático
(em 2 h. 15' e por 100 mg. de peso humido)

| N.o | $O_2$ - Basal (mm³) | $O_2$ - Lactato (mm³) | $O_2$ - Extra (mm³) | Acido lático consumido (mg) | Quociente |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 183,2 | 246,3 | 63,1 | 0,341 | 4,03 |
| 2 | 180,0 | 264,2 | 84,2 | 0,457 | 4,04 |
| 3 | 174,7 | 243,0 | 68,3 | 0,259 | 2,83 |
| 4 | 146,8 | 254,1 | 107,3 | 0,510 | 3,54 |
| 5 | 215,4 | 312,7 | 97,3 | 0,347 | 2,66 |
| 6 | 145,3 | 224,1 | 78,8 | 0,420 | 3,96 |
| 7 | 150,6 | 215,1 | 64,5 | 0,367 | 4,25 |
| 8 | 152,4 | 208,8 | 56,4 | 0,352 | 4,66 |
| 9 | 140,5 | 205,8 | 65,3 | 0,373 | 4,26 |
| 10 | 178,7 | 246,8 | 68,1 | 0,385 | 4,22 |
| 11 | 151,7 | 216,5 | 64,8 | 0,294 | 3,39 |
| 12 | 186,3 | 280,6 | 94,3 | 0,355 | 2,81 |
| 13 | 174,1 | 243,5 | 69,4 | 0,389 | 4,18 |
| 14 | 186,5 | 252,2 | 65,5 | 0,370 | 4,21 |
| 15 | 181,9 | 239,7 | 57,8 | 0,480 | 6,20 |
| 16 | 172,3 | 257,5 | 85,2 | 0,579 | 5,08 |
| 18 | 172,8 | 216,6 | 43,8 | 0,481 | 8,19 |
| 19 | 203,6 | 304,1 | 100,5 | 0,317 | 2,35 |
| 20 | 228,0 | 280,0 | 52,0 | 0,312 | 4,11 |
| Médias | 174,9 | 247,9 | 73,0 | 0,388 | 4,00 |

ele no entanto observado variações maiores: ora, é exatamente o que observamos nas tabelas 1 e 2 sendo a nossa medida muito proxima do numero considerado mais frequente por MEYERHOF.

TABELA 2

Istmo de encéfalo de galinha normal (moído em gral)

Respiração e quociente de oxidação do acido lático
(em 2 h. 15' e por 100 mg. de peso humido)

| N.º | $O_2$ - Basal ($mm^3$) | $O_2$ - Lactato ($mm^3$) | $O_2$ - Extra ($mm^3$) | Acido lático consumido (mgs) | Quociente |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 153,1 | 201,9 | 48,8 | 0,368 | 5,62 |
| 2 | 154,9 | 188,7 | 33,8 | 0,188 | 4,15 |
| 3 | 150,2 | 214,6 | 64,4 | 0,215 | 2,49 |
| 5 | 130,1 | 174,8 | 44,7 | 0,205 | 3,42 |
| 6 | 106,0 | 142,7 | 36,7 | 0,418 | 8,49 |
| 7 | 136,6 | 177,8 | 41,2 | 0,273 | 4,94 |
| 8 | 102,3 | 131,8 | 29,5 | 0,287 | 7,22 |
| 10 | 115,3 | 175,2 | 59,9 | 0,288 | 3,59 |
| 11 | 115,3 | 163,5 | 48,2 | 0,258 | 4,00 |
| 12 | 124,2 | 204,4 | 80,2 | 0,273 | 2,52 |
| 13 | 130,1 | 169,0 | 38,9 | 0,273 | 5,23 |
| 14 | 118,4 | 165,6 | 47,2 | 0,303 | 4,79 |
| 15 | 103,0 | 150,1 | 47,1 | 0,432 | 6,84 |
| 16 | 121,2 | 157,2 | 36,0 | 0,476 | 9,88 |
| 17 | 122,0 | 155,1 | 33,1 | 0,217 | 4,90 |
| 18 | 150,6 | 192,4 | 41,8 | 0,319 | 5,69 |
| 19 | 140,0 | 204,2 | 64,2 | 0,246 | 2,86 |
| 20 | 118,9 | 154,1 | 35,2 | 0,266 | 5,42 |
| 21 | 90,2 | 116,0 | 25,8 | 0,187 | 5,40 |
| 22 | 119,2 | 174,3 | 55,1 | 0,187 | 2,73 |
| 23 | 127,4 | 180,5 | 53,1 | 0,375 | 5,27 |
| 24 | 126,1 | 188,2 | 62,1 | 0,316 | 3,79 |
| 25 | 118,7 | 164,0 | 45,3 | 0,277 | 3,56 |
| Médias | 124,9 | 171,5 | 46,6 | 0,288 | 4,61 |

CEREBRO DE GALINHA EM AVITAMINOSE $B_1$ COM SÍNTOMAS NERVOSOS NITIDOS

(Tabela 3)

Consoante o que observamos anteriormente, verificámos aqui uma diminuição da oxidação de acido lático, não muito pronunciada.

De outro lado, o consumo de acido lático praticamente não difére do normal. Daí resulta naturalmente certa elevação do quociente.

TABELA 3

Cerebro de galinha beriberica
(com sintomas nervosos nitidos)
(moido em gral)

Respiração e quociente de oxidação do acido lático
(em 2 h. 15' e por 100 mg. de peso humido)

| N.º | $O_2$ - Basal ($mm^3$) | $O_2$ - Lactato ($mm^3$) | $O_2$ - Extra ($mm^3$) | Acido lático consumido (mg) | Quociente |
|---|---|---|---|---|---|
| 9 | 201,5 | 274,1 | 72,6 | 0,370 | 3,80 |
| 11 | 206,4 | 244,3 | 37,9 | 0,244 | 4,81 |
| 12 | 208,9 | 280,0 | 71,1 | 0,374 | 8,61 |
| 13 | 196,4 | 257,0 | 60,6 | 0,380 | 4,67 |
| 14 | 192,7 | 256,7 | 64,0 | 0,295 | 3,44 |
| 15 | 80,6 | 104,6 | 24,0 | 0,357 | 11,12 |
| 16 | 84,9 | 123,2 | 38,3 | 0,347 | 6,76 |
| Médias | 167,3 | 219,9 | 52,6 | 0,338 | 6,17 |

ÍSTMO DO ENCÉFALO DE GALINHA EM AVITAMINOSE $B_1$ COM SINTOMAS NITIDOS

(Tabela 4)

Aqui verificámos mais uma vez a profunda baixa de oxidação do acido lático, já anteriormente descrita.

O consumo do lactato, aqui, como no cerebro, não sofre diminuição.

Daí resulta uma forte elevação do quociente que em media atinge o dobro do valor medio normal, sem levar em conta que no caso da galinha 14, a oxidação do acido lático foi completamente anulada, dando ao quociente um valor matematico infinito.

TABELA 4

Istmo de encefalo de galinha beriberica (com sintomas nervosos nitidos)
(moído em gral)

Respiração e quociente de oxidação do acido lático, com e sem adição de vitamina $B_1$.
(em 2 h. 15' e por 100 mg. de peso humido)

| N.º | Sintomas (*) | $O_2$ - Basal ($mm^3$) | $O_2$ - Lactato ($mm^3$) | $O_2$ - Lact. + vitamina ($mm^3$) | $O_2$ - Extra ($mm^3$) | $O_2$ - Extra vitam. ($mm^3$) | ac. lático consumido (mg) | ac. lact. consumido vitamina (mg) | Quociente s/vit. | Quociente c/vit. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | ++ | 126,3 | 166,6 | 170,0 | 40,3 | 43,7 | 0,235 | 0,265 | 4,35 | 4,52 |
| 10 | ++ | 153,9 | 174,7 | 183,2 | 20,8 | 29,3 | 0,297 | 0,218 | 10,68 | 5,54 |
| 11 | +++ | 124,9 | 135,4 | 165,3 | 10,5 | 40,4 | 0,133 | 0,227 | 9,43 | 4,19 |
| 12 | +++ | 120,1 | 129,6 | 152,5 | 9,5 | 32,4 | 0,133 | 0,374 | 10,49 | 8,61 |
| 13 | ++ | 128,6 | 155,7 | 158,4 | 27,1 | 29,8 | 0,261 | 0,245 | 7,19 | 6,14 |
| 14 | +++ | 111,5 | 106,7 | 131,4 | — 4,8 | 19,9 | 0,148 | 0,158 | ∞ | 6,08 |
| 15 | ++ | 108,8 | 129,3 | 139,8 | 20,5 | 31,0 | 0,295 | 0,426 | 10,64 | 10,26 |
| 16 | +++ | 110,5 | 124,6 | 152,0 | 14,1 | 41,5 | 0,171 | 0,165 | 9,04 | 3,90 |
| 17 | +++ | 125,1 | 150.8 | 162,2 | 25,7 | 37,1 | 0,273 | 0,296 | 7,93 | 5,95 |
| Médias | | 123,3 | 141,4 | 157,2 | 18,1 | 33,9 | 0,216 | 0,263 | 8,71 | 6,13 |

(*) ++ Contratura das pernas e opistotono fraco ou aparecendo apenas por exitação do animal.
+++ Contratura das pernas e opistotono continuo e forte.

A adição da vitamina $B_1$ (*) restaura em parte a capacidade do tecido nervoso para oxidar o acido lático em bom numero de experiencias.

Queremos acentuar que a ação da vitamina sobre o consumo de acido lático não é evidente e quando verificada está dentro dos limites de erro dos métodos.

Como consequencia desses fatos, o quociente, sob a ação da vitamina, desce sensivelmente, sem no entanto atingir os valores normais.

### Cerebro e ístmo do encéfalo de galinha em avitaminose $B_1$ sem sintomas nitidos

(Tabelas 5 e 6)

Nestas galinhas, sem sintomas nervosos nitidos, nenhuma perturbação se verifica quer na oxidação, quer no consumo de acido lático, de tal modo que o quociente permanece dentro dos limites normais, tanto no cerebro como no istmo.

TABELA 5

Cerebro de galinha beriberica
(sem sintomas nervosos nitidos)
(moído em gral)

Respiração e quociente de oxidação do acido lático
(em 2 h. 15' e por 100 mg. de peso humido)

| N.º | $O_2$ - Basal ($mm^3$) | $O_2$ -Lactato ($mm^3$) | $O_2$ - Extra ($mm^3$) | Acido lático consumido (mg) | Quociente |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 170,6 | 240,1 | 69,5 | 0,286 | 2,86 |
| 2 | 144,6 | 221,9 | 77,3 | 0,363 | 3,49 |
| 3 | 148,1 | 239,6 | 91,5 | 0,450 | 3,68 |
| 4 | 187,1 | 284,5 | 97,4 | 0,399 | 3,06 |
| Médias | 162,6 | 246,5 | 83,9 | 0,369 | 3,26 |

Estas ultimas experiencias têm um grande interesse porque constituem a contraprova da idéa de que os fenómenos nervosos da avitaminose $B_1$, dependem de uma perturbação da oxidação do acido lático na zona motora central, que nas aves se encontra no ístmo do encéfalo (1).

(*) Agradecemos a "Chimica Bayer Ltda.", Rio de Janeiro, o generoso suprimento de Betaxina.

TABELA 6

Istmo de encefalo de galinha beriberica
(sem sintomas nervosos nitidos)
(moído em gral)

Respiração e quociente de oxidação do acido latico
(em 2 h. 15' e por 100 mg. de peso humido)

| N.º | $O_2$ Basal | $O_2$ Lactato | $O_2$ Extra | Acido latico consumido | Quociente |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 126,5 | 190,3 | 63,8 | 0,231 | 2,70 |
| 2 | 107,5 | 166,3 | 58,8 | 0,335 | 4,25 |
| 3 | 88,1 | 133,7 | 45,6 | 0,331 | 5,41 |
| 4 | 100,2 | 135,3 | 35,3 | 0,250 | 5,31 |
| 5 | 127,6 | 227,6 | 100,0 | 0,435 | 3,24 |
| 6 | 104,1 | 134,0 | 29,9 | 0,086 | 2,15 |
| 7 | 112,4 | 141,7 | 29,3 | 0,277 | 7,04 |
| 8 | 140,6 | 178,7 | 38,1 | 0,218 | 4,27 |
| Médias | 113,3 | 163,4 | 50,1 | 0,270 | 4,30 |

Do conjunto das experiencias realisadas nos animais em avitaminose com sintomas nervosos ressalta que a quantidade de acido latico consumida pelo encéfalo não guarda relação com o consumo de oxigenio.

Um estudo mais detalhado deste fenomeno será relatado em outra publicação.

CONCLUSÃO

1.º) O quociente de oxidação do acido latico determinado em 20 cerebros e 24 istmos do encéfalo de galinhas normais, finamente moídos, é em média de 4,00 e 4,61 respectivamente. As variações extremas observadas foram de 2,35 a 6,20 para o cerebro e 2,49 e 9,88 para o istmo do encéfalo. Estes dados e variações concordam bem com os obtidos por MEYERHOF, trabalhando com fatias de musculo.

2.º) No beri-beri tipico ha uma elevação do quociente de oxidação tanto no cerebro como no istmo do encéfalo, porque a baixa da oxidação do acido latico não é acompanhada de uma baixa no consumo de lactato.

3.°) No istmo do encéfalo de galinhas com sintomas nervosos tipicos, a vitamina tende a normalisar o quociente de oxidação do acido latico, porque, embora não influindo sobre o consumo do acido latico, restaura parcialmente a oxidação do mesmo.

4.°) No beri-beri sem sintomas nervosos não ha alteração do quociente de oxidação, porque a oxidação e o consumo do acido latico se mantem nos limites normais.


## ON THE LACTIC ACID OXIDATION QUOTIENT IN THE BRAIN OF BIRDS BOTH NORMAL AND IN $B_1$-AVITAMINOSIS

### *Abstract*

*There were made determinations both in the cerebrum and in the isthmus of the encephalum, using the technic described (4) and the one employed by Warburg. Lithium lactate was added. The tissues were thoroughly ground.*

*The normal quotients (tables 1 and 2) present an average value and show variations which may be compared to the data given by Meyerhof for the muscle slices.*

*In chicken in avitaminosis $B_1$, presenting pronounced nervous symptoms (tables 3 and 4), there is a fall in the lactic acid oxidation, especially remarkable in the isthmus. No significant change in the lactic acid comsumption was observed. An increase in the oxidation quotient is thus observed. This quocient is nearly doubled in the isthmus as compared to the normal. By the addition of $B_1$ vitamin to the isthmus the lactic acid oxidation is partially restored and, therefore, the oxidation quotient moves towards the normal.*

*In chicken in avitaminosis $B_1$, presenting no nervous symtoms, the oxidation quocient of the brain showed no differences in relation tho the normal (tables 5 and 6).*


## REFERENCIAS


1 — Galvão, P. E. e J. Pereira — 1938 — Sobre a oxidação do acido lático no encéfalo de animais normais e em avitaminose $B_1$. Localisação da lesão nos mamiferos e nas aves — *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9: 25-37.

2 — Warburg, O. — 1926 — Über den Stoffwechsel der Tumoren — Ed. Julius Springer — Berlin.

3 — Meyerhof, O. — 1930 — Die chemischen Vorgänge im Muskel und ihr Zusammenhang mit Arbeitsleistung und Wärmebildung. Ed. Julius Springer — Berlin.

4 — Galvão, P. E., C. H. Florence e J. Pereira — 1938 — Modificação do método permanganico-iodometrico para a dosagem do acido lático. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9: 39-50.

# AÇÃO DO NITRITO DE SODIO E DO BISULFITO DE SODIO SOBRE O CRESCIMENTO DO "ASPERGILLUS NIGER"

POR

V. Grieco

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Os *Aspergilli* constituem, juntamente com os *Penicillia* e as *Mucoraceae*, os bolores que por toda a parte crescem e se desenvolvem. Eles invadem os frutos, fazendo-os apodrecer, atacam os vegetais, as carnes, as farinhas, etc., contaminam a agua e outros liquidos, desenvolvem-se sobre o papel, a madeira, o couro, etc. Nos laboratorios constituem as grandes contaminações, parasitando as culturas bacteriologicas, micologicas, etc., e crescem em soluções de toda especie. Na patologia humana devem tambem ser tomados em consideração, pois podem provocar molestias, ás vezes graves.

Realizando alguns estudos sobre a morfologia e a biologia do *Aspergillus niger*, foi nossa atenção despertada pela ação de algumas substancias quimicas muito simples, no desenvolvimento desses fungos. Assim, verificámos que o nitrito de sodio e o bisulfito de sodio em dóses minimas exercem uma ação nitidamente impediente sobre o seu crescimento. Resolvemos então fazer algumas pesquizas para determinar qual o gráo de sensibilidade para essas substancias. As experiencias foram conduzidas da seguinte maneira: preparou-se o meio de cultura proposto por CZAPECK, modificado por DOX, que é o seguinte:

| | | |
|---|---|---|
| Agua distilada . . . . . . . . . . | 1.000 | cc. |
| Nitrato de sodio . . . . . . . . . . | 2,00 | grs. |
| Fosfato bipotassico . . . . . . . . . | 1,00 | " |
| Sulfato de magnesio . . . . . . . . | 0,50 | " |
| Cloreto de potassio . . . . . . . . . | 0,50 | " |
| Sulfato ferroso . . . . . . . . . . | 0,01 | " |
| Sacarose . . . . . . . . . . . . . | 30,00 | " |

Tanto a sacarose como os sais utilizados, eram de grande pureza quimica.

Essa solução foi distribuida em tubos esterilizados, 10 cc. em cada um, juntando-se a uma série deles nitrito de sodio, e á outra, bisulfito de sodio em doses crescentes; foram semeados com amostras de *Aspergillus niger*, permanecendo depois em estufa na temperatura de 30-32°; a leitura foi feita após 24 horas.

Damos a seguir 2 protocolos de 2 dessas experiencias, uma com nitrito de sodio e outra com bisulfito de sodio:

TABELA

| Nitrito de sodio | | |
|---|---|---|
| Tubos | Porcentagem; grs. em 100 cc. | Resultado após 24 hrs. |
| 1 | 0,01 % | Negativo |
| 2 | 0,005 % | » |
| 3 | 0,004 % | » |
| 4 | 0,003 % | » |
| 5 | 0,002 % | » |
| 6 | 0,001 % | » |
| 7 | 0,0009 % | » |
| 8 | 0,0008 % | » |
| 9 | 0,0007 % | » |
| 10 | 0,0006 % | » |
| 11 | 0,0005 % | » |
| 12 | 0,0004 % | » |
| 13 | 0,0003 % | Crescimento regular |
| 14 | 0,0002 % | Crescimento abundante |
| 15 | 0,0001 % | Crescimento abundante |

| Bisulfito de sodio | | |
|---|---|---|
| Tubos | Porcentagem; grs. em 100 cc. | Resultado após 24 hrs. |
| 1 | 0,01 % | Negativo |
| 2 | 0,005 % | » |
| 3 | 0,004 % | » |
| 4 | 0,003 % | » |
| 5 | 0,002 % | » |
| 6 | 0,001 % | » |
| 7 | 0,0009 % | » |
| 8 | 0,0008 % | » |
| 9 | 0,0007 % | » |
| 10 | 0,0006 % | » |
| 11 | 0,0005 % | » |
| 12 | 0,0004 % | » |
| 13 | 0,0003 % | » |
| 14 | 0,0002 % | » |
| 15 | 0,0001 % | Crescimento regular |

Testemunhas — Crescimento abundante (Nitrito de sodio)

Testemunhas — Crescimento abundante (Bisulfito de sodio)

Pela tabela verificamos que o nitrito de sodio na proporção de 0,0004 gms. por 100 cc. de meio, impede o crescimento do fungo; para o bisulfito de sodio, que é ainda mais ativo, são suficientes 0,0002 gms. por 100 cc. para impedir o crescimento do cogumelo.

## ACTION OF THE SODIUM NITRITE AND SODIUM BISULPHITE UPON THE GROWTH OF THE "ASPERGILLUS NIGER"


### *Abstract*

*The A. verifies the great sensibility of Aspergillus niger, in relation to sodium nitrite and sodium bisulphite.*

*The sodium nitrite concentration necessary to prevent the growth of A. niger is 0,0004%, and that of the sodium bisulphite is 0,0002 %.*


———o———

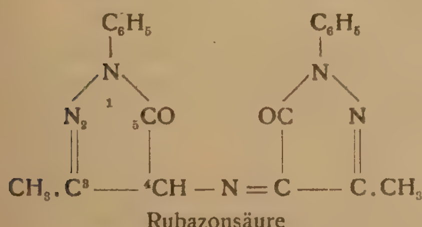
# DAS SCHICKSAL DES PYRAMIDONS IM ORGANISMUS. ISOLIERUNG VON 3 NEUEN STOFFWECHSELPRODUKTEN: 4-AMINOANTIPYRIN, 4-ACETYLAMINO-ANTIPYRIN UND 4-OXYANTIPYRIN

VON

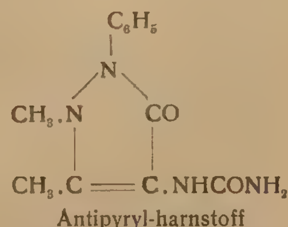
Josef Halberkann und Fritz Fretwurst, Hamburg-Barmbeck

Eines der am meisten gebrauchten Arzneimittel, sei es allein oder in Kombination mit anderen, besonders mit Barbitursäuren, ist das auch Amidopyrin genannte Pyramidon. Trotzdem ist über sein Verhalten im Körper noch wenig bekannt.

Der einzige, der sich ernsthaft mit der Isolierung von Stoffwechselprodukten des Pyramidons beschäftigte, war M. JAFFE (1), der darüber in den Jahren 1901 und 1902 berichtete. Aus dem Harn von Hunden, die täglich 3 bis 5 g peroral erhielten, gewann er als ersten Abkömmling die Rubazonsäure, die nur ausnahmsweise und dann nur in sehr geringer Menge als solche, hauptsächlich als eine Vorstufe ausgeschieden wird, die nach Ansäuern des Harnes mit Salzsäure durch Luftoxydation in die rote Rubazonsäure übergeht. Die Ausbeute betrug nur 1 bis 1 ½ %, die wahre Menge wird aber in Anbetracht von Verlusten auf 3 % geschätzt. JAFFE hielt diese Vorstufe nicht für eine Leukoverbindung, sondern für 1-Phenyl-3-methyl-4-aminopyrazolon, aus dem KNORR (2) durch Oxydation die Rubazonsäure bereits dargestellt hatte. Das von uns im Harn gefundene, nachher ausführlicher zu erwähnende 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-amino-pyrazolon, kurz 4-Aminopyrazolon genannt, kann diese Vorstufe nicht sein, da seine wässrige Lösung bei verschiedenem pH an der Luft beständig ist, keinesfalls aber Rubazonsäure bildet.



Rubazonsäure



Antipyryl-harnstoff

Während JAFFE die Rubazonsäure im Hundeharn nicht präformiert fand, beobachtete er sie in frischem Menschenharn, zweifelt aber,

ob sie regelmässig oder nur ausnahmsweise als solche ausgeschieden wird. Nach unseren Erfahrungen erscheint sie regelmässig, abhängig von der eingenommenen Pyramidon-Menge, im Menschenharn, allerdings lange nicht in dem Masse, wie sie JAFFE mit 3 % beim Hundeharn annimmt. Die von uns aus Menschenharn isolierte Rubazonsäure war nach Analyse und Eigenschaften mit der von JAFFE aus Hundeharn gewonnenen identisch. Wir sind gemäss der Intensität der Färbung des Harnes der Ansicht, dass noch andere rote Farbstoffe gebildet werden müssen, von denen nur die Rubazonsäure leicht zu isolieren ist.

Häufig findet man die Rubazonsäure im Sediment des Menschenharnes als in Sternen angeordnete, feine, oft gebogene und verästelte Nädelchen, selten in derben rhombischen Kryställchen. Bisweilen sind diese Krystalle den Epithelzellen aus Niere und Blase in reichlicher Menge aufgewachsen. Auch in ganz frischem Harn kann man sie finden. Diese Tatsache (3) ist kaum bekannt, ist zu wissen aber angezeigt, da man im ersten Augenblick im Zweifel sein kann, ob es sich um das ähnlich krystallisierende Bilirubin (Haematoidin) handelt.

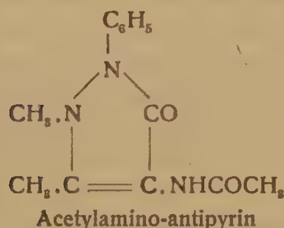
In seiner Publikation aus dem Jahre 1902 hat JAFFE die Isolierung eines zweiten Stoffwechselproduktes mitgeteilt; es ist 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-ureido-pyrazolon, kurz Antipyryl-harnstoff genannt. Er gewann 6 % davon aus dem Hundeharn, schätzt aber die wirklich ausgeschiedene Menge wesentlich höher ein. Die Isolierung ist nach unseren Erfahrungen am Menschenharn sehr schwierig, da der Antipyrylharnstoff sich in seinen Eigenschaften dem Kreatinin so ähnlich verhält, dass eine Trennung nur sehr schwer gelingt.

Nach Pyramidon-Einnahme zeigt der Harn stets eine mehr oder minder starke Linksdrehung, die auf die Bildung einer gepaarten Glukuronsäure hinweist. JAFFE spricht davon in beiden Publikationen, hat aber später nichts darüber berichtet; er erwähnt nur in seiner ersten Publikation, dass vielleicht der Paarling der Glukuronsäure das gleiche Oxyantipyrin sei, das sein Schüler LAWROW (4) nach Verfütterung von Antipyrin im Harn der Hunde fand. Am Schlusse dieses Berichtes werden wir ausführlicher darauf zurückkommen.

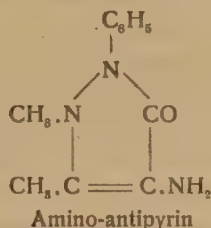
Die durch JAFFE bekannt gewordenen Stoffwechselprodukte des Pyramidons sind also: Rubazonsäure, Antipyrilharnstoff und eine gepaarte Glukuronsäure, die vielleicht Oxyantipyrin-Glukuronsäure sein könne.

Bei in unserem Laboratorium recht zahlreich auszuführenden toxikologischen Untersuchungen beobachteten wir bei Prüfungen auf Morphium im Harn von Patienten, die Pyramidon genommen hatten, dass in der nach dem Verfahren von Stas-Otto erhaltenen Morphium-Fraktion sich eine Substanz fand, die schon wegen ihrer Menge etwas

anderes wie Morphium sein musste. Sie war manchmal direkt krystallinisch und ihre Lösung in Wasser wurde durch Eisenchlorid tief rot mit einem Stich ins Violette gefärbt. Diese Substanz liess sich leicht rein erhalten und wir konnten sie als 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-acetylamino-pyrazolon, kurz 4-Acetylamino-antipyrin genannt, charakterisieren. Da diese in Wasser leicht lösliche Verbindung jedoch mit



Acetylamino-antipyrin



Amino-antipyrin

Eisenchlorid keine Färbung ergibt, musste der die Färbung liefernde Stoff ein anderer sein. Diesen gelang es gleichfalls zu isolieren und ihn als 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-amino-pyrazolon, kurz 4-Amino-antipyrin genannt, zu identifizieren. — Wie man sieht, sind beide Stoffe nahe verwandt und aus letzterem erhält man durch Acetylieren in vitro leicht den ersteren.

Über die Art der zweckmässigen Isolierung und Trennung, deren Beschreibung hier zu weit führen würde, wollen wir später an anderer Stelle berichten. Es sei nur kurz gesagt, dass es uns gelang, aus einer wässrigen Lösung beider Stoffe sie zu trennen und quantitativ wieder zu gewinnen. Einer Tagesmenge Harn, in dem beide Substanzen gelöst worden waren, konnten wir das Acetylamino-antipyrin zu 99% und das Aminoantipyrin zu 93% wieder entziehen. Dass beide Substanzen bisher nicht aufgefunden wurden, mag zum Teil an den Löslichkeitsverhältnissen liegen; sie sind in Wasser sehr leicht und in Äther kaum löslich. — Es sei bemerkt, dass beide Substanzen in der chemischen Literatur (5) längst bekannt sind.

Die Entstehung des Acetylamino-antipyrins bildet ein weiteres Beispiel für die schon häufiger gefundene Acetylierungsfähigkeit des Organismus für Aminoverbindungen. Dieser wohl in der Leber sich abspielende Entgiftungsvorgang, obwohl das Aminoantipyrin nach R. Kobert (6) vielmals weniger toxisch ist als Pyramidon, reiht sich den Beobachtungen bei anderen Aminoverbindungen an, von denen $\gamma$-Phenyl-$\alpha$-aminobuttersäure, p-Amino-phenylessigsäure, m-und p-Aminobenzoesäure, p-Aminobenzolsulfonamid (Prontosil) und 4-(4'-Aminobenzolsulfonamido-) benzolsulfondiäthylamid (Uliron) genannt sein mögen.

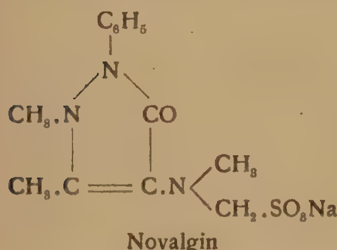
Diesen Beispielen schliesst sich also das Aminoantipyrin an, das allerdings nur teilweise acetyliert wird. Primär wird im Organismus Aminoantipyrin gebildet, woraus sekundär die Acetyl-Verbindung entsteht. JAFFE nahm nun an, dass zur Bildung der Rubazonsäure ausser der Entmethylierung am $N_2$ des Pyramidon-Moleküls auch die beiden Methyl-Gruppen des Dimethylamin-Restes solcher Art entfernt würden, dass also das N-Atom selbst im Molekül erhalten bliebe. Letztere Möglichkeit halten wir für wenig wahrscheinlich. Verständlicher erscheint, wozu der Organismus sehr wohl in der Lage ist, ein einfacher Austausch des $(CH_3)_2$ N-Restes durch den $H_2$ N'-Rest, eine Aminolyse, obgleich es uns nicht gelang, nach Pyramidon-Einnahme Dimethylamin im Harn nachzuweisen. Wenn auch Spuren von Dimethylamin im normalen Menschenharn vorkommen sollen(7), wurde andererseits festgestellt, dass diese Substanz nach subkutaner Verabreichung im Tierkörper völlig abgebaut wird (8).

Wie bereits gesagt, fanden wir nach Pyramidon-Einnahme im Harn stets Acetylamino-antipyrin und Aminoantipyrin nebeneinander, und wir betonen, dass sekundäre Umwandlungen bei der schonenden Behandlung des Harns während der Isolierung ausgeschlossen sind. — Um nun die Mengen dieser im Körper gebildeten Verbindungen kennen zu lernen, nahm der eine von uns an 2 aufeinander folgenden Tagen pro die 4 x 0.5 g Pyramidon. Aus den Harnen isolierten wir 1.226 g Acetylamino-antipyrin und 0.801 g Aminoantipyrin, das sind, umgerechnet auf Pyramidon, 28.9% und 22.8%, insgesamt 51.7% der eingenommenen 4 g Pyramidon. Dabei erstreckte sich die Ausscheidung des ersteren wenigstens über 4 Tage, während die des letzteren am vierten Tage nach der Einnahme beendet war. Ob daraus zu schliessen ist, dass bei Einnahme kleinerer Pyramidon-Mengen eine relativ stärkere Acetylierung des gebildeten Aminoantipyrins erfolgt, möge dahin gestellt bleiben. Das Verhältnis der ausgeschiedenen Mengen Acetylamino-antipyrin zu Aminoantipyrin ist 1:0.79.

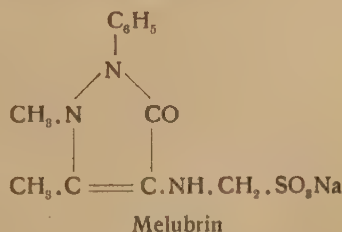
Interessant schien es uns zu verfolgen, wie sich Aminoantipyrin selbst im Organismus verhalten würde. Zu diesem Zwecke nahm der eine von uns an 2 aufeinander folgenden Tagen pro die 4 x 0.25 g Aminoantipyrin, und wir isolierten unter Berücksichtigung der Harnmengen der beiden folgenden Tage, obwohl die Ausscheidung dann noch nicht ganz beendet war, 0.605 g Acetylamino-antipyrin und 0.710 g Aminoantipyrin; das sind, esteres umgerechnet auf Aminoantipyrin, 21.1% und 35.5%, zusammen 60.6% der eingenommenen 2 g Aminoantipyrin. Hier verschiebt sich das Verhältnis der Ausscheidung gegenüber dem Pyramidon-Selbstversuch. Acetylamino-antipyrin: Ami-

noantipyrin = 1:1.41. — Es scheint demnach so, als ob bei einem starken Angebot von Aminoantipyrin die Acetylierung nachhinkt.

Eine mit dem Pyramidon verwandte und ebenfalls als Medikament benutzte Verbindung ist das Natrium-Salz der 1-Phenyl - 2,3-dimethyl-pyrazolon-4-methyl-aminomethansulfonsäure, das in Deutschland Novalgin genannt wird. Nach subkutaner Injektion von 2 g fanden wir im 24-Stundenharn des Menschen sowohl Acetylamino-antipyrin wie auch Aminoantipyrin, und zwar von ersterem 0.309 g und von letzterem 0.117 g, oder, umgerechnet auf Novalgin, 21. 0 % und 9. 6 %, zusammen 30. 6 % der Einnahme. Das Verhältnis ist 1:0.46. — Dieses Verhältnis verschob sich zu Gunsten des Aminoantipyrins in einem Selbstversuch nach peroraler Einverleibung. Es wurden 4 x 0. 5 g pro die an 2 aufeinander folgenden Tagen genommen. Die Untersuchung wurde bis zum Verschwinden der gesuchten Verbindungen im Harn ausgedehnt, was am dritten Tage nach der Einnahme der Fall war. Auch hier verschwand, wie im Pyramidon-Versuch, das Aminoantipyrin praktisch etwas früher als seine Acetylverbindung. Von den eingenommenen 4 g Novalgin fanden wir im Harn wieder als Acetylamino-antipyrin 0.808 g und als Aminoantipyrin 0.551 g, oder, umgerechnet auf Novalgin, 27.5% und 22.6%, insgesamt 50.1%. Hier ist das Verhältnis 1:0.82, also ähnlich wie im Pyramidon-Selbstversuch. Ob dabei die Art der Einverleibung und die ausgedehntere Untersuchung der Harne eine Rolle spielt, muss unentschieden bleiben.



Novalgin



Melubrin

Ein dem Pyramidon und besonders dem Novalgin sehr ähnliches Medikament ist das Natrium-Salz der 1-Phenyl-2,3-dimethyl-pyrazolon-4-aminomethan-sulfonsäure, in Deutschland kurz Melubrin genannt. Auch dieses verhält sich im Abbau dem Pyramidon und Novalgin gleich. In einem Selbstversuch, nach Einahme von 4 x 0.5 g pro die an 2 aufeinander folgenden Tagen isolierten wir aus dem Harn, wobei die Ausscheidung am vierten und für Aminoantipyrin am dritten Tage nach der Einnahme beendet war, 0.595 g Acetylamino-antipyrin und 0.733 g Aminoantipyrin oder, umgerechnet auf Melubrin, 19. 4 % und 28. 8 %, zusammen 48. 2 %. Hier ist das Verhältnis mit 1:1.49 sehr zu Gunsten

des Aminoantipyrins gegenüber den Selbstversuchen mit Pyramidon und Novalgin verschoben, aber ganz ähnlich wie im Selbstversuch mit Aminoantipyrin, was nach den chemischen Eigenschaften des Melubrins auch verständlich ist.

Im Hinblick auf unsere Feststellungen, dass nach Einnahme von Novalgin und Melubrin neben Acetylamino-antipyrin in erheblicher Menge Aminoantipyrin ausgeschieden wird, ist eine Beobachtung von DEZANI und BORSALINO SEMERIA (9) bemerkenswert, dass der Harn sich durch Jodzusatz orange, rubinrot bis tief weinrot färbt je nach der Menge des eingenommenen Novalgins oder Melubrins, wogegen diese Stoffe selbst mit Jod keine Färbung geben. Sie vermuten deshalb, da Aminoantipyrin als solches wie auch nach dem Durchgang durch den Körper diese rotviolette Farbe liefert, dass Novalgin und Melubrin in Aminoantipyrin oder eine damit verwandte Substanz übergehe. Ihre Vermutung ist durch unsere Untersuchungen, die auch die quantitativen Ausscheidungen umfassten, bestätigt worden. Im allgemeinen, und besonders beim Pyramidon, ist aber solchen Farbenreaktionen nicht viel Wert beizumessen, da von manchen Autoren für den positiven Ausfall im Harn das Pyramidon selbst (6,10), andererseits aus ihm entstandenes Antipyrin (11) verantwortlich gemacht wurde.

Nach der Literatur vermag der Hund, im Gegensatz zu Kaninchen und Mensch, die an einem Benzol-Kern haftende $NH_2$-Gruppe nicht zu acetylieren (12), während er die aliphatisch gebundene $NH_2$-Gruppe, auch wenn sie in einer Seitenkette des Benzol-Kernes steht, acetylieren kann (13). Es war deshalb von Interesse zu verfolgen, wie sich in dieser Beziehung Pyramidon oder das aus ihm entstehende Aminoantipyrin beim Hunde verhalten würde. Unsere Versuche ergaben, dass nach Verfütterung von 6 g Pyramidon etwa 5 % als Acetylamino-antipyrin und etwa 10 % als Aminoantipyrin ausgeschieden werden. Diese Versuche bedürfen in quantitativer Hinsicht einer Nachprüfung, ergeben aber einwandfrei, dass anders als Kaninchen und Mensch sich der Hund verhält, der vielleicht die Hauptmenge des Pyramidons in Antipyrylharnstoff überführt. JAFFE isolierte aus dem Hundeharn zwar nur 6 % davon, schätzt aber wegen der Schwierigkeit der Isolierung die wahre Menge wesentlich höher. Jedenfalls scheint sich die $NH_2$-Gruppe des im Körper des Hundes gebildeten Aminoantipyrins mehr wie eine aromatisch als wie eine aliphatisch gebundene $NH_2$-Gruppe zu verhalten, sodass nur eine geringe Menge acetyliert wird.

Deshalb war es weiterhin interessant zu prüfen, wie sich Acetylamino-antipyrin im Körper des Hundes verhalten würde. Nach Verfütterung von 2 x 3 g an 2 aufeinander folgenden Tagen konnten wir, unter Einbeziehung der Harnmengen der nächsten 4 Tage, dem Harn

insgesamt 90 % unverändertes Acetylamino-antipyrin wieder entziehen, aber keine Spur Aminoantipyrin nachweisen. Ob die restlichen 10 % auf Verluste, die ja leicht erklärlich sind, entfallen oder in Antipyrilharnstoff übergeführt wurden, muss dahin gestellt bleiben. Jedenfalls hat eine Verseifung zu Aminoantipyrin nicht oder nur unwesentlich stattgefunden. — Es sei in diesem Zusammenhange daran erinnert, dass o-Acetylamino-benzoesäure ebenfalls unverändert im Harn des Hundes erscheint (14).

Rückblickend ist zu sagen, dass nun als Stoffwechselprodukte des Pyramidons bekannt sind: Rubazonsäure, ferner Aminoantipyrin und Acetylamino-antipyrin, die beim Menschen die Hauptmenge ausmachen, und Antipyrylharnstoff, der anscheinend beim Hunde die Hauptmenge bildet. Diesen Antipyrilharnstoff aus Menschenharn zu isolieren gaben wir uns grosse Mühe, aber nur einmal konnten wir ihn, und zwar nur in sehr geringer Menge erhalten. Ausser diesen 4 Substanzen müssen jedoch andere im Pyramidon-Harn stecken.

Pyramidon selbst aus dem Harn wieder zu gewinnen, ist JAFFE trotz aller Bemühungen nicht gelungen. Wir fanden nur einmal bei einem Menschen, der bald nach der Einweisung ins Krankenhaus starb, Pyramidon. Die geringen Mengen der eingenommenen Medikamente (Bromural, eine unbekannte Barbitursäure und Pyramidon) in Magen und Harn konnten die Todesursache nicht sein. Es muss angenommen werden, dass der moribunde Organismus alles Pyramidon umzuwandeln nicht mehr fähig war, sodass ein Teil, nämlich 0.06 g, unverändert in den bei der Sektion entnommenen 770 ccm Blasenharn gefunden werden konnten. An Acetylamino-antipyrin und Aminoantipyrin enthielt der Harn nur 0.13 g. Ob in Organen von Personen, die an grossen, in selbstmörderischer Absicht genommenen Dosen von Pyramidon starben, unveränderte Substanz auffindbar ist, wie es mehrmals behauptet wurde (15), bedarf sehr der Bestätigung.

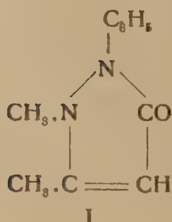
Ausser den genannten müssen noch weitere Stoffwechselprodukte entstehen. Denn es ist bekannt, dass der Harn nach der Einnahme von Pyramidon den polarisierten Lichtstrahl nach links dreht, und dass, während Fehling'sche Lösung unverändert bleibt, Nylanders Reagens mehr oder weniger stark reduziert wird. Alle bisher genannten, dem Harn entzogenen Verbindungen: Rubazonsäure, Aminoantipyrin, Acetylamino-antipyrin und Antipyrylharnstoff, wie auch Pyramidon selbst, tun dies nicht, ebensowenig wie Antipyrin, dessen Ausscheidung irrtümlich einmal behauptet worden ist (11). Welcher Stoff verursacht nun diese Reduktion? Ist es vielleicht, worauf ja die Literatur hinweist, eine im Harn vermutete gepaarte Glukuronsäure? obwohl diese meist eine solche Wirkung nicht ausüben. Zur exakten Beantwortung dieser

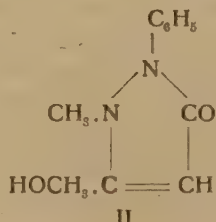
Frage wäre die Gewinnung und Prüfung der gepaarten Glukuronsäure erforderlich. Deren Isolierung macht aber meist grosse Schwierigkeiten. Es wurde deshalb vorerst versucht, den Paarling der Glukuronsäure darzustellen.

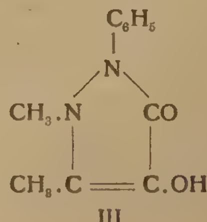
In einer Publikation äussert ENKLEWITZ (16), nach dem Benedict's qualitatives und quantitatives Zuckerreagens von Pyramidon-Harn reduziert wird, die Ansicht, dass es sich um eine Pyramidon-Glukuronsäure handele, da erst nach der Säurehydrolyse eine positive Farbreaktion mit Eisenchlorid eintrete. Diese Ansicht ist durch nichts begründet und falsch, da unverändertes Pyramidon sich mit Glukuronsäure gar nicht zu paaren vermag, und zweitens nach Pyramidon-Einnahme der Harn stets wegen des vorhandenen Aminoantipyrins, also schon vor der Säurehydrolyse, mit Eisenchlorid eine Farbreaktion liefert.

Einleuchtend erscheint dagegen die Vermutung von JAFFE, dass es sich um eine Oxyantipyrin-Glukuronsäure handeln könne, und zwar um dieselbe, die sein Schüler LAWROW (4) nach Verfütterung von Antipyrin an Hunde aus dem Harn als Bariumchlorid-Bariumdoppelsalz isolierte. Aus den Analysen dieses Doppelsalzes schloss LAWROW als Paarling der Glukuronsäure auf Oxyantipyrin, das er vergeblich darzustellen versuchte und trotz Ankündigung später nicht beschrieben hat.

Die von LAWROW vorgeschlagene Formel für das vermeintliche Oxyantipyrin erschien uns unwahrscheinlich; er nahm an, dass die Methyl-Gruppe in 3-Stellung des Antipyrins (I) zum Carbinol (II) oxydiert worden sei. Es ist zwar durch neuere Arbeiten (17) bekannt, dass eine Methyl-Gruppe im Organismus zum Alkohol, der sich dann mit Glukuronsäure paart, oxydiert werden kann (Campher zu $\pi$ - Oxycampher, Epicampher zu $\pi$ - Oxyepicampher, und andere), aber es lag doch näher im Falle des Pyramidons anzunehmen, dass das Oxyantipyrin, sollte es überhaupt in Betracht kommen, am einfachsten durch Ersatz der Dimethylamino-Gruppe durch die Hydroxyl-Gruppe entstehen könnte. Es wäre dies ein hydrolytischer Vorgang, der uns auch



in vitro zu realisieren gelang. Wir erhitzten Pyramidon mit der berechneten Menge n-Schwefelsäure im Einschmelzrohr 7 Stunden lang auf 165° und konnten, wenn auch nur zu 12 %, 4-Oxyantipyrin (III) erhalten. Die geringe Ausbeute lässt auf eine gewisse Unbeständigkeit der Verbindung schliessen. — Dieses 4-Oxyantipyrin erwies sich identisch mit dem bereits synthetisch hergestellten, das durch Methylieren von 1-Phenyl-3-methyl-4-oxypyrazolon (18) oder durch Kochen von 4-Bromantipyrin mit Kalilauge (19) oder sehr bequem durch Erhitzen von "Pyramidon-Nitrit" mit wässriger Natriumsulfitlösung (20) entsteht.

Auf obiges Ergebnis hin haben wir Harn nach Pyramidon-Einnahme und nach vorheriger Entfernung des vorhandenen Acetylaminoantipyrins und Aminoantipyrins mit 3% Salzsäure 2 Stunden lang rückfliessend gekocht, und es ist uns gelungen nach einem vorher ausprobierten Analysengang 4-Oxyantipyrin zu isolieren und einwandfrei zu charakterisieren. Seine Menge war verhältnismässig klein, sodass auch hier angenommen werden darf, dass das Oxyantipyrin unter den gegebenen Verhältnissen recht unbeständig war.

Nach der Feststellung, dass Pyramidon in vitro in Oxyantipyrin umgewandelt und solches nach dem Kochen mit Säuren dem Harn entzogen werden kann, haben wir sein Verhalten im Organismus geprüft und Kaninchenversuche und einen Selbstversuch vorgenommen.

Drei Kaninchen wurden mit der Schlundsonde pro kg. 0.2, 0.3 und 0.5 g Oxyantipyrin eingegeben, das ohne Beschwerden gut vertragen wurde. Die 245 ccm Harn des letzten, 1.9 kg schweren Kaninchens, der - 0.35 % (bezogen auf Glucose) drehte, wurde verarbeitet. Es wurden isoliert etwa 0.011 g freies und 0.152 g an Glukuronsäure gebundenes Oxyantipyrin. Das Verhältnis ist also 1 : 14. — Nun wurde ein Selbstversuch angeschlossen, in dem an 2 aufeinander folgenden Tagen pro die 4 x 0.5 g Oxyantipyrin peroral genommen wurden. Das Ergebnis war, dass freies Oxyantipyrin höchstens in Spuren eliminiert wurde, wogegen dem Harn nach dem Verkochen mit Salzsäure 3.099 g Oxyantipyrin = 77 % der Einnahme entzogen wurden. Dabei geht die Ausscheidung des Glukuronids sehr schnell vor sich; 24 Stunden nach Aussetzen der Einnahme enthielt der dann gelassene Harn nur noch etwa 0.4 % der Einnahme. Eine Bildung von Aminoantipyrin, die ja durch Austausch des Hydroxyls gegen die Amino-Gruppe denkbar wäre (Aminolyse), von Acetylamino-antipyrin oder von Rubazonsäure war nicht zu beobachten.

Anschliessend haben wir noch festgestellt, dass nach der Einnahme von Antipyrin das gleiche 4-Oxyantipyrin entsteht, wie nach der Einnahme von Pyramidon. In einem Selbstversuch, in dem an 2 auf-

einander folgenden Tagen pro die 4x0.5 g Antipyrin genommen wurden, konnten dem Harn 2. 5 % unverändertes Antipyrin und 25 % vorher an Glukuronsäure gebundenes Oxyantipyrin entzogen werden. Es scheinen aber noch andere Stoffwechselprodukte des Antipyrins im Harn zu stecken, deren Art von uns noch aufgeklärt werden soll.

Wenn wir nun die schätzungsweise Ausscheidung des 4-Oxyantipyrins, das nur als Glukuronid im Menschenharn erscheint, nach der Einnahme von Pyramidon mit der quantitativ verfolgten Ausscheidung nach Einnahme von Oxyantipyrin und Antipyrin vergleichen, so erscheint uns die ausgeschiedene Menge im ersteren Falle so gering, dass sich die Meinung aufdrängt, es müsse doch noch ein anderes Glukuronid vorhanden sein. Oder man müsste annehmen, dass entweder das Oxyantipyrin-Glukuronid nur eine geringe spezifische Drehung besitzt oder dass das freiwerdende Oxyantipyrin sekundär durch andere Substanzen verändert wird.

Unsere Beobachtungen sind auch für die Toxikologie von grossem Wert. Die Einnahme von Pyramidon und seiner Verwandten Novalgin, Melubrin und Aminoantipyrin kann meist an der durch Rubazonsäure und wahrscheinlich andere rote Farbstoffe verursachten Färbung des Harnes erkannt werden, einwandfrei festzustellen und mengenmässig abzuschätzen ist sie durch die Isolierung und Charakterisierung des leicht rein zu erhaltenden Acetylamino-Antipyrins, das zu etwa 25% entsteht. Das ebenfalls in grösserer Menge sich bildende Aminoantipyrin, das an seiner Färbung mit Eisenchlorid ohne weiteres zu erkennen ist, lässt sich nach seiner Isolierung schwieriger reinigen. Geringere Mengen führt man zweckmässig durch Kochen mit Schwefelkohlenstoff unter Zusatz von Schwefel in den bei 248° unter Zersetzung schmelzenden Diantipyril-thioharnstoff über.

Zum Schlusse zählen wir die nun bekannten Stoffwechselprodukte des Pyramidons auf: Rubazonsäure F 182-184°, Antipyril-4-harnstoff F 249°, 4-Aminoantipyrin F 108-109°, 4-Acetylamino-antipyrin F 198-199° und 4-Oxyantipyrin F 183-184°, das nicht in freiem Zustande, sondern nur als Glukuronid im Menschenharn erscheint. Die 3 letzten Substanzen wurden von uns aufgefunden.

## LITERATUR

1 — M. Jaffe — Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 34: 2737 (1901); 35: 2891 (1902).

2 — L. Knorr — Annalen der Chemie 238: 137. 189. 192 (1887).

3 — Neubauer-Huppert — "Analyse des Harns" 1910. Seite 1482 und 1571.

4 — D. Lawrow — Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 33: 2345 (1910) und Zeitschrift für Physiologische Chemie 32: 112 (1901).

5 — L. KNORR und T. GEUTHER — Annalen der Chemie 293. 56 (1896); L. KNORR und F. STOLZ — ebenda 293: 58. 64 (1896).
6 — R. KOBERT — Zeitschrift für klinische Medizin 62: 57 (1907).
7 — H. LÖFFLER — Zeitschrift für Physiologische Chemie 232: 259 (1935).
8 — H. FUCHS — Zeitschrift für Biologie 98 (neue Folge 80), 473 (1938); Chemisches Zentralblatt 1939. I. 2816.
9 — S. DEZANI und A. M. BORSALINO SEMERIA — Industria chimica 9: 764 (1934); Chemisches Zentralblatt 1935. I. 427.
10 — W. FILEHNE — Zeitschrift für klinische Medizin 32: 568 (1897); A. JOLLES: Zeitschrift für analytische Chemie 37: 441 (1898); P. HOFFMANN: Archives internationales de Pharmacodynamie et de Therapie 6: 171 (1899).
11 — R. PROUZERGUE — Journal de Pharmacie et de Chimie (7) 27: 372 (1923); Chemisches Zentralblatt 1923. III. 418.
12 — H. HILDEBRANDT — Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 3: 365 (1902).
13 — F. KNOOP und E. KERTESS — Zeitschrift für Physiologische Chemie 67: 489 (1910); 71: 252 (1911).
14 — J. B. MUENZEN, L. R. CERECEDO und C. P. SHERWIN — Journal of biological Chemistry 67: 469 (1926).
15 — T. GEILL — Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin 7: 344 (1926); K. WAGNER — Sammlung von Vergiftungsfällen 2: 111 Abteilung A (1931); P. SCHNEIDER — ebenda 3.133 Abteilung A (1932).
16 — M. ENKLEWITZ — Journal of Pharmacology and Experimental Therapie 54: 100 (1935).
17 — Y. ASAHINA und M. ISHIDATE — Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 66: 1673 (1933); 67: 71 (1934); F. REINARTZ und W. ZANKE: ebenda 67: 548. 589 (1934); 69: 2259 (1936); F. REINARTZ, W. ZANKE und K. FAUST: ebenda 67: 1536 (1934).
18 — L. KNORR und R. PSCHORR — Annalen der Chemie 293: 50 (1896).
19 — L. KNORR und R. PSCHORR — D. R. P. 75975; Friedländer: Fortschritte der Theerfabrikation 3: 942 (1896).
20 — M. BOCKMÜHL — Medizin und Chemie: 3: 303 (1936).

——— —o———

# FEBRIS MACULOSA INTERMITTENS

VON

Prof. Dr. C. Hegler, Hamburg

1916 beschrieb DEYCKE zwei Fälle von monatelangem intermittierendem Fieber und gleichzeitig auftretenden blassroten Knoten oder flach-erhabenen Flecken an verschiedenen Stellen der Körperoberfläche. Alle diagnostischen und therapeutischen Mittel versagten. Ein Fall starb an *Meningitis* (Sektion), der andere, leichtere Fall wurde durch Optochin dauernd geheilt.

FRIEDEMANN und DEICHER beschrieben 1926 ebenfalls monatelangen Fieberverlauf im Quartana-Typ mit Hauterscheinungen, ähnlich einem *Erythema nodosum,* ohne Organbefund, konnten aber bei sehr sorgfältiger Technik aus dem Blute eines Kranken Meningococcen züchten. DECASTELLO und WELTMANN schlugen den Namen "Febris maculosa intermittens" für ein Krankheitsbild vor, welches lange dauerndes intermittierendes Fieber und schubweise auftretende fleckige und knotige Hautausschläge darbietet. In den meisten bisher veröffentlichten Fällen handelte es sich um eine Infektion durch Meningococcen, in einigen Fällen von DECASTELLO und WELTMANN aber auch um Gonococceninfektion. In einzelnen Fällen gelang es überhaupt nicht, die Ätiologie zu klären. SINCKE hat aus dem Hamburger Tropeninstitut 1935 einen solchen Fall mitgeteilt:

Der 48jährige Bergmann zeigte schmerzhafte Knoten, die verschwanden und nach einigen Monaten im Quartana-Typ wieder einsetzten. Organisch war kein Befund zu erheben. Leukozyten 14600, Blutbild o. B., Senkung 93:115 nach Westergren. Alle Versuche, einen Erreger durch Kultur oder Tierimpfung nachzuweisen, verliefen negativ. Patient erhielt ein neues organisches Arsen antimon-Präparat (Bayer) (Sdt 386 B), 0,2 g intravenös jeden vierten Tag injiziert. Unmittelbar nach der dritten Injektion zeigte sich Fieber und Schüttelfrost. Nach 10 Injektionen blieb Patient ständig fieberfrei, die Hautknoten verschwanden, es trat Heilung ein.

In allen diesen Fällen wird zunächst an Malaria gedacht, sodann an eine chronische Infektion durch Meningococcen oder Gonococcen, wohl auch an die von FRIEDEMANN beschriebene Lentaform der Meningococcen-Sepsis; gelegentlich auch an Lymphogranulomatose, Fünftagefieber, Rattenbisskrankheit.

Im Laufe der Jahre hatte ich zweimal Gelegenheit dieses Krankheitsbild zu sehen, ohne dass in diesen Fällen — der eine verlief tödlich — die bakteriologischen bzw. histologischen Untersuchungen einen Erreger, speziell Meningococcen, nachweisen liessen.

Fall 1, Peter P., 52jähriger Bäcker, wird am 18. 7. 35 wegen Hautleidens zunächst auf die Dermatologische Abteilung eingewiesen. Seit etwa 20 Jahren leidet er an Rheumatismus im linken Oberarm. Vor etwa 3 Wochen stellte sich nachts ein leichter Schüttelfrost ein, der am anderen Morgen sich wiederholte. Es folgten Kopfschmerzen und Schwindel. Am 5. Tage traten rote Beulen an Armen und Beinen auf, die aber nicht juckten, degegen auf Druck etwas schmerzhaft waren. Ausserhalb des Krankenhauses hatte Patient Salizyl verordnet bekommen. Bei der Aufnahme bestand 39° Fieber, kein besonderer Befund über den Organen. An den Unterarmen und Unterschenkeln, über der linken Schulter einzelne etwa kirschkerngrosse, etwas erhabene, bläulich-rote, derbe Stellen, die auf Druck etwas schmerzhaft sind; daneben einzelne dunkel gefärbte ältere Ausschläge. Es wurde zunächst an ein *Erythema nodosum* gedacht und Salizyl verordnet. Keine wesentliche Besserung. Blutsenkung 120. Am 29. 7. Verlegung auf die I. Medizinische Abteilung. Die Ergänzung der Anamnese ergab keinerlei Anhalt für früher überstandenen Gelenkrheumatismus, keine Tropenanamnese, keine Geschlechtskrankheiten; Wassermannsche Reaktion negativ. Sowohl an den inneren Organen als am Nervensystem keinerlei pathologischer Befund. Intermittierendes Fieber von wochenlanger Dauer, täglich morgens abfallend und abends ansteigend. Das knotenförmige Exanthem bleibt lange bestehen mit einzelnen Nachschüben. Zwei dieser Hautherde werden excidiert: Es finden sich multiple akute Entzündungsherde in der Cutis und Subcutis, die Entzündungszellen, hauptsächlich Leukozyten, liegen vielfach in der Umgebung der Gefässe. Einzelne Entzündungsherde haben fast abscedierenden Charakter. "Es handelt sich wohl zweifellos um embolische Herde". Bakterien waren in Schnittpräparaten nicht nachzuweisen. Die Senkungsgeschwindigkeit war dauernd stark beschleunigt, 120 bis 138 mm. Neben einer sekundären Anaemie (Hb 60%, Erythrozyten 3,7 Millionen) zeigte sich ausgesprochene Leukopenie (nie über 2800) mit eindeutiger Linksverschiebung und toxischer Granulierung. Thrombozytenzahl normal, Blutungszeit 2 Minuten, KUERTEN'sche Probe negativ. Im weiteren Verlauf entwickelte sich eine aplastische Anaemie mit hochgradiger Granulopenie ohne Zeichen haemorrhagischer Diathese. Die immer wieder — zu günstigen Zeiten und mit optimalen Nährböden — wiederholten Blutkulturen blieben durchweg steril. Auch sämtliche serologischen Untersuchungen, Agglutination auf Typhus, Paratyphus und Bang, Komplementbindungsreaktion auf Gonococcen ergaben negatives Resultat, desgleichen der Tierversuch, Überimpfung auf Mäuse. Trotz des hoch fieberhaften Charakters ist der Verlauf ein ziemlich eintöniger. Niemals findet sich ein sicherer krankhafter Befund an den inneren Organen, insbsondere war die Milz niemals vergrössert. Ab und zu treten am Rumpf und an den Extremitäten neue rote Hautinfiltrate auf, während die älteren langsam verschwinden und anfänglich noch eine Verhärtung im Unterhautzellgewebe zurücklassen. Auf Grund der Mitteilungen von SINCKE, dass in seinem Fall das von der Firma Bayer gelieferte Arsen-Antimon Präparat Sdt 386 B günstigen Erfolg hatte, gaben wir auch unserem Kranken, nachdem Neosalvarsan ohne Erfolg verwendet worden war, dieses Präparat. Fünf intravenöse Injektionen von 0,1 — 0,3 g ergaben keinerlei Erfolg, ebensowenig eine Bluttransfusion. Nach etwa 8wöchigem Verlauf stellte sich eine Bronchopneumonie beider Unterlappen ein unter gleichzeitiger Verschlimmerung der sekundären Anaemie, nach etwa 10wöchiger Dauer verstarb der Patient.

Obduktionsbefund: Sehr ausgedehnte, konfluierende, zum Teil in eitriger Einschmelzung begriffene Herdpneumonien in beiden Unterlappen. Frische, fibrinöse Pleuritis über den erkrankten Lungenabschnitten. Emphysem

und Ödem der Lungen. Geringe Anaemie der Lungen. Bronchitis. Entzündliche Schwellung der Bifurkations- und Halslymphknoten. Flaches Geschwür an der rechten Seite der Epiglottis. Sehr schlaffes, anaemisches, dilatiertes Herz. Keine Atherosklerose. Schlaffe Milz. Anaemie und Ödem der Leber. Trübe Schwellung und beträchtliche Verfettung der Nieren. Rindenadenome in der linken Niere. Ziemlich lipoidarme Nebennieren. Dilatation der Harnblase. Thromben und Venensteine im Plexus prostaticus. Fleckförmige Pseudomelanose der Magenschleimhaut. Atrophie der Magenschleimhaut. Multiple zum Teil in narbiger Abheilung begriffene, unspezifische Geschwüre im untersten Ileum, dicht oberhalb der Klappe. Zottenmelanose der Dünndarmschleimhaut. Teilweise rotes Mark im rechten Femur. Geringe Arthritis deformans im rechten Kniegelenk. Papulöses und maculöses Exanthem am Rücken und in beiden Schenkelbeugen sowie am rechten Gesäss. Ödem und geringe Anaemie des Gehirns.

Histologisch: Haut: In der Subkutis perivaskuläre Zellinfiltrate von Rund - und polymorphkernigen Leukocyten. Beginnende Gewebseinschmelzung. Gramfärbung: Keine Gram + oder — Bakterien. Leber: o. B. Geringe zentrale kleintropfige Leberzellverfettung. Niere: Trübe Schwellung und Kernzerfall in den Harnkanälchenepithelien (Fäulnis). Vereinzelte arteriosklerotische Narben, Myocard: o. B.. Milz: Starker Blutpigmentgehalt. Sehr hochgradige Haemosiderinablagerung in den Reticulumzellen. Lunge: Fibrinöse Lappenpneumonie mit reichlich Abschilferung und Schwellung der Alveolarepithelien.

Auch durch die Sektion ergab sich somit keine Klärung des Krankheitsbildes, insbesondere fand sich keine *Meningitis,* keinerlei Anhalt für eine chronische Meningococcen- oder Gonococceninfektion, kein Sepsisentwicklungsherd.

2. Fall, Otto B., 70jähriger Rentner, hat 1904 eine Luesinfektion durchgemacht, Quecksilberschmierkur, Ende Juli 1935 aus voller Gesundheit plötzlich erkrankt mit Schüttelfrost, Erbrechen, Durchfall, hohem Fieber; am ganzen Körper trat ein flohstichartiges Exanthem auf, das nicht juckte. Die ganzen 14 Tage bestand stark remittierendes Fieber mit zeitweise Schüttelfrost. Wird am 7. 8. 35 als Typhusverdacht eingewiesen. Dieser Verdacht kann nicht bestätigt werden. Es besteht zunächst bis 21.8. intermittierendes Fieber mit täglichen Schüttelfrösten, hoher Blutsenkung (95), 16000 Leukozyten. Am Rumpf und insbesondere an den Extremitäten ein fleckiges, flohstichartiges Exanthem, bis zu Linsengrösse, wenig erhaben, nicht juckend. Innere Organe ohne Befund. Blutkulturen steril, ebenso alle Agglutinationen negativ. Irgendeine Eintrittspforte für Sepsis war nicht zu finden. Im Blutausstrich keine Malariaparasiten. Trotzdem wurde der Versuch einer Chininbehandlung gemacht (7 Tage lang 5x0,2 Chinin hydrochlor). Das Fieber sank nicht ab, dagegen veränderte sich das Exanthem auffallend: die anfangs blassroten Flecken wurden tiefrot, es traten punktförmige Blutungen am ganzen Körper auf, Rumpel-Leede positiv. Ein eigentliches Kommen und Gehen des Exanthems war nicht zu bemerken. Nachdem Ende August nochmals eine Fieberwelle eingesetzt hatte, wurde ab 30. 8. das Präparat Sdt 386 B verabreicht: Nach der dritten Injektion wurde die Temperatur ab 9. 9. normal und blieb normal. Der Erfolg war überraschend: Schon nach den ersten beiden Spritzen setzte enorme Schuppung an den vom Exanthem besonders betroffenen Hautpartien, vor allem den Händen und Füssen ein. Rasche Besserung des Allgemeinbefindens. Nach drei Wochen konnte Patient gebessert zum Kassenarzt entlassen werden. Heilung.

Hervorgehoben sei, dass in meinen beiden Fällen eine chronische Infektion durch Meningococcen oder Gonococcen so gut wie ausgeschlossen ist. Die Fälle von larvierter Meningococcensepsis, wie sie kürzlich noch KUEMMERLING beschrieb, sind uns wohl bekannt. Ich habe darüber in GUNDELs "ansteckende Krankheiten" 1935 berichtet. Ob es sich bei der Febris maculosa intermittens wirklich um ein einheitliches Krankheitsbild handelt, muss dahingestellt bleiben; wahrscheinlicher dürfte es sich, ähnlich wie beim Erythema nodosum, um eine besondere Reaktionsweise besonderer Individuen auf verschiedenartige Schädigungen handeln. Das Wesentliche ist nicht ein besonderer Erreger, sondern die eigenartig zyklisch gesteuerte Reaktion des Individuums mit oft sehr regelmässigem, malariaähnlichem Fiebertypus, Schüttelfrösten, Schweissen, Kopfschmerzen, aber meist auffällig geringem oder negativem Befund an den inneren Organen, Dabei hohe Blutsenkungswerte und ein häufig mit den Temperaturschüben parallel verlaufendes Exanthem, das teils an ein Erythema nodosum, teils an Masern, oder Röteln, z. T. auch an Erythema exsudativum multiforme erinnert. Gelegentlich können Hautblutungen, besonders bei den schwer verlaufenden Fällen sich dazu gesellen.

Die histologische Untersuchung in unserem Fall ergab wie in den von DECASTELLO und WELTMANN mitgeteilten histologischen Befunden das Bild einer metastatischen Dermatose mit zum Teil tiefgehenden entzündlichen Infiltraten. Gelenkschwellungen waren in meinen Fällen nicht zu verzeichnen. Auffälligerweise war der Verlauf bei dem 70jährigen Kranken — anscheinend im Anschluss an die Verabreichung des Arsenantimonpräparats — ein günstiger, während dasselbe Mittel bei dem 52jährigen Kranken versagte.

## LITERATUR

DEYKE, G. — 1916 — Zwei Fälle einer unbekannten Art von Wechselfieber. *Mü. med. Wo.* S. 508.

FRIEDEMANN und DEICHER — 1926 — Die Lentaform der Meningococcensepsis. *D. m. W.* S. 733.

DECASTELLO und WELTMANN — 1930 — Febris maculosa intermittens. *Wien. Arch. f. inn. Med.* **20**: 429.

SINCKE — 1935 — Zur Frage der febris maculosa intermittens und ihrer Therapie. *D. m. W.* S. 827.

HEGLER, C. — 1935 — Meningococceninfektionen in: Gundel, "Ansteckende Krankheiten".

KÜMMERLING — 1937 — Larvierte Meningococcensepsis. *Med. Klin.* S. 821.

BINGOLD, K. — 1939 — Pathogenese und Klinik der Meningokokken-Sepsis. *D. Arch. f. Klin. Medizin* **183**: 422.

———o———

# A "FAIXA DAS NERVURAS", UMA DOENÇA DE VIRUS DO FUMO ENCONTRADA NO ESTADO DE SÃO PAULO

POR

M. Kramer e K. Silberschmidt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 39-41

## INTRODUÇÃO

Nos principios de Fevereiro de 1939, em Tremembé (Cantareira), num campo experimental de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) preparado para estudos sobre a disseminação, *in natura*, da doença "Mosaico do fumo", encontrámos diversos pés de fumo da variedade Virginia bright com sintomas de uma doença de virus diferente do Mosaico do fumo. As observações e os estudos preliminares feitos sobre esta doença, que designaremos por "Faixa das nervuras", são apresentados no presente trabalho. Tratando-se de uma doença semelhante, em largos traços, ás causadas pelo virus Y das batatinhas, doenças essas que diferem, todavia, em certas peculiaridades, da fórma por nós observada, vejamos quais as indicações da literatura que se referem á existencia de tais variedades aberrantes do virus Y.

## HISTORICO

As primeiras observações de campo sobre a ocorrencia de uma doença semelhante, no seu aspéto geral, á causada pelo virus Y, dotada entretanto de caracteres distintos, foram feitas nos Estados Unidos por W. D. Valleau e E. M. Johnson, em 1927-28 e 1930 (15, 16). Esses autores dão uma descrição dos sintomas que notaram no fumo, frizando que se manifesta uma clorose geral de algumas das folhas velhas, exceto nos tecidos imediatamente visinhos das nervuras. Dessa maneira, o desenho das nervuras destaca-se do resto do limbo da folha, pela sua coloração verde escura, o que levou os citados autores a denominar a doença, que citam como sendo de ocorrencia comum nos campos de Kentucky, como "Vein-margin", nome alterado posteriormente para "Veinbanding".

Em 1935, E. M. Johnson (5), procurando elucidar a importancia da disseminação dessa doença no campo, observou que plantas de fumo da var. White Burley, plantadas proximo de batatinhas, se infectaram com o Veinbanding, fazendo assim crer que o Veinbanding é uma doença da batatinha, transmissivel ao fumo.

Desde as suas primeiras constatações, porem, foram efetuados nos laboratorios e por diversos autores, estudos sobre essa doença e seu agente causador. O objeto principal de todos estes trabalhos foi o de verificar, com exatidão, as relações existentes entre o virus Veinbanding e o virus Y das batatinhas.

Nos primeiros trabalhos, dedicados ao estudo do virus Veinbanding, alguns autores verificaram grandes analogias entre este virus e o virus Y, considerando-os por isto identicos; por essa razão renunciaram a uma diferenciação mais detalhada entre eles.

Assim, K. M. SMITH (13) em 1931, comentando as observações publicadas por VALLEAU e JOHNSON a respeito do virus Veinbanding, manifestou a opinião de que o Veinbanding era presumivelmente identico ao virus Y das batatinhas, o qual já tinha sido exaustivamente estudado e descrito anteriormente pelo mesmo autor.

Alem de K. M. SMITH, tambem K. L. KOCH (8), o primeiro autor que averiguou, em 1933, tanto as principais qualidades físicas do suco infectivo, como as especies das plantas hospedeiras do virus Veinbanding, acreditou na identidade dele com o virus Y.

Mas a conclusão a que chegaram ambos os autores mencionados e que foi recentemente adotada tambem por outros autores, assim por exemplo num trabalho de L. K. JONES, C. L. VINCENT & EARL F. BURK (7a), devia ser unilateral, porque faltou a K. M. SMITH, naquela época, o conhecimento exato do virus Veinbanding e a K. L. KOCH, o do virus Y de K. M. SMITH.

Logo, porem, que os autores que se ocuparam com o assunto começaram a fazer permuta de material doente e a realizar estudos verdadeiramente comparativos sobre o virus Y e o virus Veinbanding, notaram que, apezar da grande semelhança entre ambos, existem pequenas diferenças que justificam a separação dos dois agentes infecciosos. Como neste resumo da literatura nos limitamos á parte puramente experimental desses trabalhos, não entramos em detalhes sobre a questão de serem as duas fórmas de virus originadas independentemente uma da outra ou constituir uma delas, mera mutação da outra.

Deixando de lado essa questão teorica, podemos agora constatar que P. MURPHY (12), em 1935, foi um dos primeiros autores que frizaram a existencia de pequenas diferenças entre os 2 virus. De acordo com os resultados de MURPHY, o virus Veinbanding é mais dificil de transmitir por fricção com suco do que o virus Y, e produz, alem disso, sintomas mais brandos em certas variedades de batatinhas.

Ainda em 1935, KOCH & JOHNSON (9) chegaram ao mesmo resultado ao confrontar os 2 agentes infecciosos contidos em plantas de

batatinhas cujos tuberculos provinham de diversos países. Esses autores verificaram, em seus estudos, que os tuberculos de quasi todos os países em questão encerravam o virus Veinbanding, nitidamente diferente do virus Y, contido naquela ocasião somente em batatinhas de origem inglesa. Notaram, alem disso, diferenças quanto ás especies dos hospedeiros dos dois virus, considerando neste ponto *Solanum nigrum* como imune ao virus Y, porem suscetivel ao virus Veinbanding.

O trabalho de KOCH & JOHNSON é ainda de interesse especial para nós, pelo fato de haverem eles encontrado o virus Veinbanding em plantas de batatinha cujos tuberculos foram recebidos do Brasil.

O resultado principal desse trabalho, isto é, a indicação da possibilidade de diferenciar experimentalmente o virus Veinbanding do virus Y, foi confirmado subsequentemente por T. P. DYKSTRA (1), em 1936. Este friza o fato, aliás já mencionado por MURPHY, de que o efeito do virus Y na batatinha é mais severo do que o do Veinbanding, e baseia nesses resultados a conclusão de que os 2 virus são semelhantes entre si, mas não identicos. A mesma opinião foi manifestada por L. K. JONES e C. L. VINCENT (7), que se dedicaram, em 1937, ao estudo dos caracteres do virus Veinbanding e investigaram a suscetibilidade de diversas variedades de batatinhas a este virus, sem porem realizar, ao mesmo tempo, ensaios sobre o virus Y.

Os ultimos estudos estritamente comparativos entre os dois virus foram efetuados em 1939, por DYKSTRA (2), que salientou ainda uma vez as diferenças que existem entre ambos. Nas experiencias de DYKSTRA os sintomas provocados pelo virus Veinbanding em *Nicotiana tabacum* e em *Capsicum annuum* foram menos pronunciados do que os causados pelo virus Y. Além disso, este ultimo virus provocou a quéda de folhas (*leaf-drop*) em certas variedades de batatinhas, fáto este não observado com o virus Veinbanding; por outro lado, ainda, o virus Y não produziu qualquer reação nas flôres do genero *Petunia*, em contraste com o virus Veinbanding que estimulou a formação de flores manchadas em plantas deste ultimo genero.

Depois de resumir, assim, os resultados dos principais trabalhos, que contribuiram para o melhor conhecimento do virus Veinbanding da batatinha, resta ainda mencionar um trabalho dedicado ao estudo de um virus, que tambem é muito semelhante ao virus Y, mas não inteiramente identico nem a este nem ao virus Veinbanding dos autores americanos.

Este virus, denominado virus P, foi encontrado por E. KOEHLER (10) em 1937, nas batatinhas das variedades alemãs "Erdgold" e "Stär-

kereiche", distinguindo-se apenas ligeiramente, pelas suas propriedades fisicas, do virus Y de K. M. SMITH.

No nosso resumo historico deviamos mencionar ainda as pesquizas de P. A. MURPHY & ROBERT MC KAY (12 a), P. A. MURPHY & J. B. LOUGHNANE (12 b) e outros, referentes ao virus A. E' verdade que esse virus tambem apresenta analogias com o virus Y; difere, porem, tão nitidamente dele e do virus estudado por nós, que não existe o perigo de ambos poderem ser confundidos. Achamos superfluo, por isso, relatar aqui os trabalhos dedicados ao estudo do virus A. Voltaremos todavia a tratar dessas formas de virus na parte da Discussão, reservada para estabelecer a comparação final das formas acima mencionadas com o virus por nós encontrado.

## MATERIAL ESTUDADO

As plantas de fumo da variedade Virginia, que forneceram o material para os estudos referidos no presente trabalho, encontravam-se reunidas na extremidade de uma fileira de 50 plantas do nosso campo experimental de fumo.

Quando os sintomas dessa doença espontanea apareceram, isso se deu somente entre as 10 ultimas plantas dessa fileira, ao passo que as 40 primeiras se mantiveram sadias. Em todos os casos tratava-se de plantas já proximas do periodo de florescimento, que tinham permanecido durante dois meses no campo sem mostrar quaisquer sintomas de doença de virus.

Os sintomas observados nessas plantas no campo consistiram em manchas redondas, regulares, de uma coloração verde-clara nas folhas medias, especialmente na sua parte apical. O aparecimento dessas manchas não foi acompanhado por deformações do limbo das folhas, nem pela ocorrencia de areas salientes *(blistering)* ou ainda por uma rugosidade pronunciada das folhas. Já o fáto dessas folhas terem permanecido lisas sugeria que a doença se diferenciava do "Mosaico do fumo", que existia em diversos outros pés do mesmo campo. As manchas verde-claras, do diametro de 2-5 mms., dispunham-se no limbo entre as nervuras de 2.ª ordem, dando assim a impressão de um mosqueado (*mottling*) acentuado das folhas.

Tais sintomas prematuros permaneceram durante o resto do periodo de vegetação das plantas e só nas folhas novas notámos, mais tarde, como complemento desses sintomas, pequenas linhas amarelas, curtas, acompanhando em parte as nervuras (estampa 39, figs. *A* e *B*) e ocasionalmente tambem um amarelecimento geral e o aparecimento de faixas escuras, pouco acentuadas, nas nervuras das folhas medias.

## METODOS

O material escolhido no campo era cortado, por meio de uma tesoura esterilisada, em pequenos pedaços, que por sua vez eram bem amassados num almofariz esterilisado. Após a adição de um volume de agua distilada equivalente ao peso do material estudado, a pasta era prensada manualmente atravez de etamine humidecido; o liquido resultante fornecia, assim, o suco normal 1:1. Todavia, foram tambem empregados nas inoculações sucos diluidos a 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000, entendendo-se que essas misturas se referem a diluição por volume. Assim, para dar um exemplo de como obtivémos suco 1:10, tomámos 1 cc. de suco normal com uma pipeta calibrada e acrescentámos 9 cc. de agua distilada.

Nos casos em que se estudou o ponto termal de inativação, o suco normal foi colocado em pequenos tubos de ensaio, que eram dispostos em rolhas perfuradas que nadavam livremente na agua do banho-maria, ou numa lamina de metal perfurado que se adaptava a um dos discos do banho-maria mantido em conveniente temperatura.

As inoculações eram feitas de cada vez em uma só folha de cada especie de planta experimentada, friccionando-a delicadamente da base á extremidade e vice-versa. Este tipo de inoculação era levado a efeito por meio de uma pinça esterilisada que prendia uma porção de algodão embebido em suco de virus. Para facilitar a fricção, debaixo de cada folha inoculada apoiava-se a tampa de uma placa de Petri igualmente esterilisada.

As plantas usadas nas experiencias foram cultivadas em caixas de madeira recobertas por etamine, ou no interior de estufas, quer dizer, em condições que as garantiam até certo gráo contra infecção acidental por meio de insétos. De quando em vez faziam-se fumigações e pulverisações para eliminar eventuais vectores das doenças de virus que, apesar de todo cuidado, tinham aparecido nas plantas.

## TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DA DOENÇA

### GENERALIDADES

O primeiro objetivo de nosso trabalho consistiu em verificar si a doença podia ser transmitida pelo suco a diversas variedades de fumo (*Nicotiana tabacum*). Damos a seguir a descrição mais detalhada de uma experiencia efetuada com a variedade Samsun de *N. tabacum*, a especie *N. glutinosa* e a especie *N. digluta* (hibrido de *N. glutinosa* x *N. tabacum*), esta ultima planta estudada por HOLMES (4) e

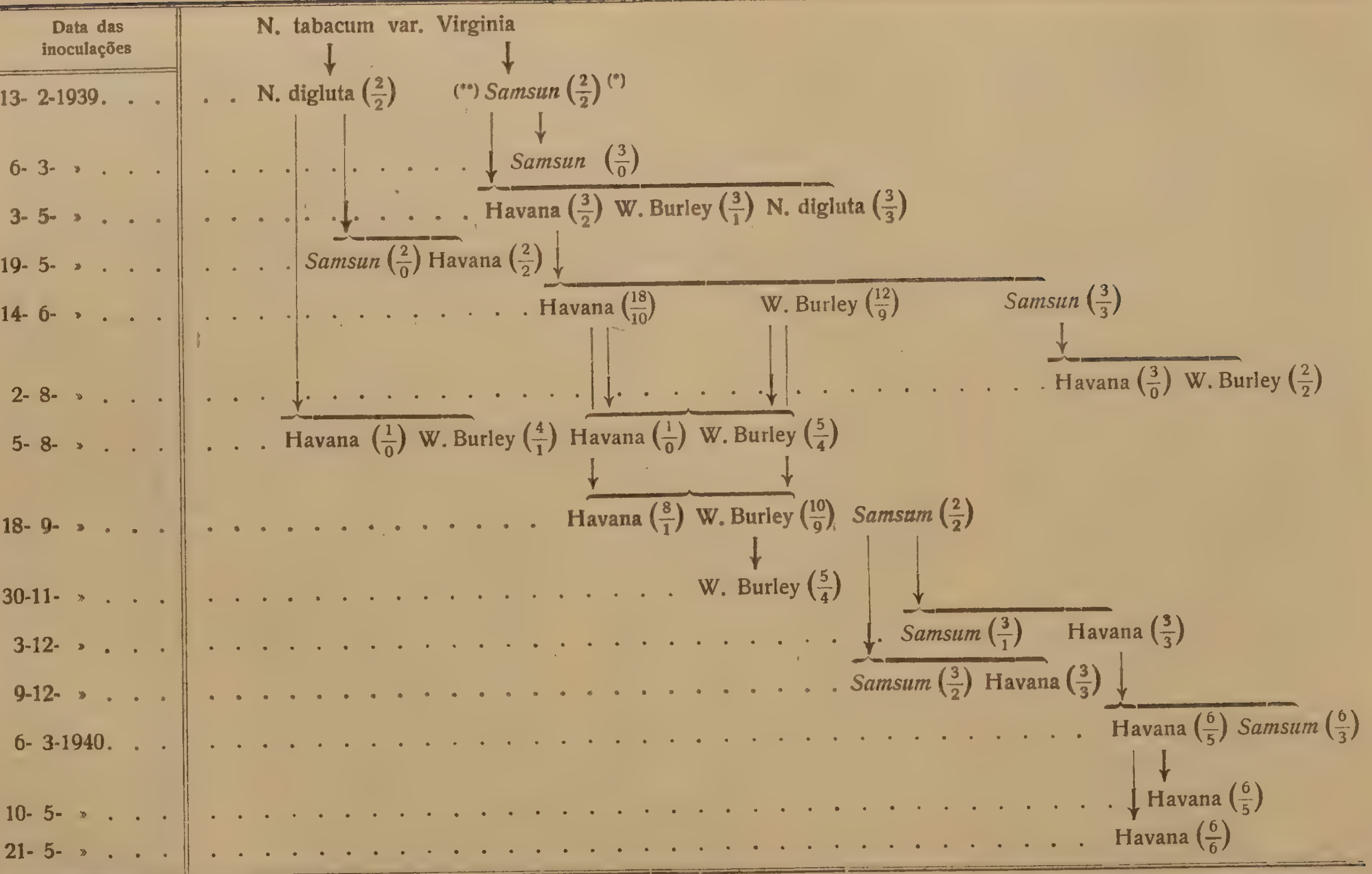



GRAFICO 1. Passagens do virus da "Faixa das nervuras", em diversas variedades de N. tabacum e na especie N. digluta. (*) Neste grafico, os numeros acima do traço de fracção representam as plantas inoculadas, e os numeros de baixo, as plantas infectadas. (**) A variedade Samsun acha-se destacada para efeito de Discussão.

D. Kostoff (11) e muito recomendada por J. Johnson (6) como planta indicadora de Mosaico do fumo. Esta experiencia foi realizada em 13/2/39, em 2 plantas de cada uma das especies citadas.

O primeiro sintoma de doença apareceu em 23/2, em uma planta da var. Samsun, manifestando-se na fórma de um esclarecimento das folhas medias e novas e de um mosqueado fraco. Em 14/3, as duas plantas da var. Samsun e uma do hibrido mostraram nitidos sintomas da doença, isto é, faixas escuras nas nervuras (*veinbanding*) das folhas novas, medias e até nas folhas velhas. As plantas inoculadas de *N. glutinosa* permaneceram sadias.

Quanto á comparação dos sintomas da doença observados no campo e no laboratorio, pode-se dizer que as inoculações artificiais produziram mais o quadro sintomatologico de faixas escuras das nervuras, ao passo que no campo o sintoma mais caracteristico foi o aparecimento das manchas verde-claras, redondas, antes descritas. Em todo caso, a experiencia provou que de fáto é possivel transmitir a doença pelo suco, sendo porem relativamente dilatado o periodo de incubação.

Desde a primeira experiencia, realizada em 13/2/39, o virus da "Faixa das nervuras" foi muitas vezes multiplicado, usando para inoculação novos grupos de plantas das variedades suscetiveis de fumo. Dessa maneira foram feitas, só com uma amostra desse virus, mais de 20 repicagens, respectivamente nas variedades Samsun, White Burley e Havana de *N. tabacum* e na especie *N. digluta* (Grafico 1). Todavia para determinar uma lista parcial de hospedeiros do virus da "Faixa das nervuras", muitas especies de Solanaceas foram tambem inoculadas, para se verificar a suscetibilidade dos hospedeiros em questão. Focalizaremos agora alguns resultados gerais obtidos com essas inoculações.

### SUSCETIBILIDADE DE DIFERENTES VARIEDADES DE *N. tabacum*

Além das variedades já citadas na experiencia de 13/2, foram tambem inoculadas, em outras experiencias, mais as variedades Havana, White Burley, Sumatra, Kentucky e Amarelo Rio Grande. Todas essas variedades de *Nicotiana tabacum* se mostraram suscetiveis ao virus, apresentando porem certas diferenças quanto ao quadro sintomatologico e ao periodo de incubação do virus no interior das plantas.

Considerando primeiro as diferenças entre essas diversas variedades de fumo no tocante ao periodo de incubação ou seja ao tempo

necessario para a manifestação dos sintomas, podemos tirar alguns resultados das nossas experiencias de 14/6/39 e 30/11/39. Nessas experiencias, em que inoculámos ao mesmo tempo plantas comparaveis de algumas das variedades de fumo acima citadas, notámos que os primeiros sintomas da doença apareceram na ordem seguinte:

| | White Burley | Havana | Samsun |
|---|---|---|---|
| Dias após a inoculação | 14 | 17 | 20 |

Deste quadro podemos verificar que nas plantas da variedade White Burley os sintomas apareceram um pouco antes do que nas plantas das 2 outras variedades.

Daremos agora uma descrição geral do quadro sintomatológico observado nas variedades inoculadas de *N. tabacum*, onde frizamos as outras diferenças na manifestação dos sintomas.

1. *Samsun* — Os primeiros sintomas aparecem nas folhas médias sob a forma de linhas claras das nervuras terciarias (*clearing*) e de um mosqueado (*mottling*) com o aspecto de manchas claras, circulares, na região do limbo, entre as nervuras secundarias (est. 39, fig. *C*). Mais tarde, na ponta das folhas medias delimitam-se estreitas faixas verde-escuras das nervuras. Na ponta das folhas novas, porem, nota-se um mosqueado pouco definido, tambem na forma de manchas circulares verde-claras. Finalmente as folhas velhas têm, como sintoma tardio, as faixas verde-escuras (*veinbanding*) das nervuras secundarias e terciarias, cujo aparecimento começa a dar-se na ponta das folhas medias como já foi antes explicado.

Quanto ao carater geral dessas faixas, que consideramos como um distintivo da doença em questão, devemos acentuar que elas se assemelham muito ás causadas pelo virus Y na mesma variedade de fumo. Diferem porem das provocadas pelo virus Y, devido á sua distribuição geralmente mais uniforme e continua sobre todo o limbo das folhas.

E' de notar, finalmente, que na doença que observamos essas faixas escuras das nervuras nunca têm aparencia bolhosa *(blistering)* o que facilita, por outro lado, a sua distinção dos sintomas causados pelo virus do Mosaico de fumo.

2. *Havana* — Devido á coloração verde-escura de suas folhas, os sintomas são, a principio, menos perceptiveis que na var. Samsun. Percebe-se no começo um ondulamento do limbo das folhas novas (di-

ferença de Samsun), seguido logo de um esclarecimento completo das nervuras das mesmas folhas. Finalmente surgem as faixas escuras das nervuras secundarias e terciarias, tanto nas folhas medias como na ponta das folhas novas (estampa 41, figs. *G* e *H*). Nesta variedade as faixas chamam especialmente a atenção por serem bem largas e localisarem-se de preferencia próximo das margens das folhas.

3. *White Burley* — Por causa da coloração verde-clara de suas folhas, os sintomas nesta variedade de *N. tabacum* são bem distintos e mais precoces ainda que nas var. Havana e Samsun. Esses sintomas iniciam-se por um esclarecimento acentuado das nervuras secundarias e terciarias, esclarecimento que se limita aqui geralmente á parte basal das folhas novas; cerca de 1 semana depois, todas as nervuras das folhas medias mostram um esclarecimento intenso, e mais ou menos 5 dias mais tarde ainda, a folha nova começa a mostrar, na ponta, um *veinbanding* fraco. Todavia, somente cerca de 40 dias após a inoculação é que as plantas infectadas apresentam a doença em toda a sua plenitude, caracterizada então pelas faixas escuras, largas, nas nervuras das folhas velhas, medias e novas (est. 41, fig. *I*) as quais se tornam tanto mais visiveis quanto as folhas vão envelhecendo e amarelando.

4. *Sumatra.*

5. *Kentucky* e

6. *Amarelo Rio Grande* — Manifestaram sintomas de doença semelhantes ás da variedade Havana, apresentando faixas escuras largas, distintas, nas nervuras, somente cerca de 25 dias após a inoculação (est. 40, figs. *D* e *E a*).

Alem destes estudos em variedades de *Nicotiana tabacum,* realizámos ainda experiencias em outras especies de *Nicotiana,* para observar seu comportamento a respeito da doença. Mencionaremos aqui, agora, os resultados obtidos nos ensaios com as especies *Nicotiana glutinosa, N. sylvestris, N. rustica* e *N. langsdorffii.*

### SUSCETIBILIDADE DE DIVERSAS ESPECIES DE NICOTIANA

7. *N. glutinosa* — Efetuámos com esta especie diversas experiencias de transmissibilidade, que, porem, sempre deram resultados inteiramente negativos. Damos a seguir a lista dessas experiencias, para demonstrar como foram consecutivas as tentativas para obter infecção durante mais de um ano, e para registar, por outro lado, o numero total das plantas inoculadas.

TABELA 1

Inoculações de *N. glutinosa* com o virus da "Faixa das nervuras"

| Data das inoculações | Inóculo | N.º de plantas | |
|---|---|---|---|
| | | Inoculadas | Infectadas |
| 13-2-1939 | Suco normal | 2 | 0 |
| 3-3- » | » » | 6 | 0 |
| 4-4- » | » » | 4 | 0 |
| 4-4- » | » a 80º | 4 | 0 |
| 14-4- » | » normal | 9 | 0 |
| 19-5- » | » » | 2 | 0 |
| 19-5- » | » a 60º | 2 | 0 |
| 19-9- » | » normal | 2 | 0 |
| 3-1-1940 | » » | 3 | 0 |
| 6-3- » | » » | 3 | 0 |
| 10-6- » | » » | 4 | 0 |
| 25-6- » | » » | 5 | 0 |

Como se vê dos resultados deste quadro, em 46 plantas de *Nicotiana glutinosa* nunca conseguimos obter resultados positivos de inoculação e isto no correr de mais de um ano. Insistimos nos resultados negativos destas experiencias, porque o virus Y provoca com facilidade sintomas nitidos nesta especie, e porque tambem ha duvidas na literatura, quanto ao comportamento desta especie perante o proprio virus Veinbanding. Na parte da discussão voltaremos a tratar destes resultados.

8. *N. sylvestris* — Nesta especie a mais comum expressão de sintomas é a presença de faixas claras, intensas, nas nervuras secundarias e terciarias das folhas novas, cerca de 25 dias após a inoculação. 10 dias depois, as folhas medias e novas apresentam, especialmente nas nervuras terciarias, linhas claras bem nitidas, que se alargam no ponto de confluencia dessas nervuras. Plantas dessa mesma especie, inoculadas com o virus Y, mostraram nesta ocasião não só as faixas claras das nervuras mas tambem um mosqueado caracteristico, de placas circulares bem claras (est. 41, fig. *J*) seguido pela formação de faixas escuras, irregulares, nas nervuras secundarias das folhas medias.

9. *N. rustica* — Esta especie é pouco suscetivel ao virus. Em media, 18 dias após a inoculação aparece um esclarecimento fraco das nervuras das folhas novas, ao qual sucede um mosqueado acompanhado de faixas escuras das nervuras. Estas manchas são curtas e localisadas de preferencia próximo das margens das folhas. O estado final

da doença caracterisa-se apenas pelas faixas escuras, curtas, nas nervuras secundarias e terciarias, distribuidas irregularmente no limbo, porem mais concentradas nas margens das folhas medias e novas (estampa 40, fig. *E b*).

10. *N. langsdorffii* — Alista-se tambem entre as plantas que podem ser infectadas pelo virus, reagindo 25 dias depois das inoculações pelo suco, na fórma de um mosqueado fraco como placas cloroticas circulares, de centro mais escuro, nas folhas medias por inteiro e, nas novas, especialmente na ponta (est. 40, fig. *F*).

Passaremos agora á descrição dos sintomas observados em plantas de outros generos da familia das Solanaceas.

SUSCETIBILIDADE DE OUTRAS SOLANACEAS

11. *Datura stramonium* — Negativa.

12. *Solanum nodiflorum* — Negativa ou duvidosa.

13. *Petunia hybrida* — Negativa ou duvidosa.

14. *Solanum tuberosum* — Positiva. Diversas variedades de batatinha alistam-se tambem entre as especies que nas nossas experiencias de inoculação mostraram sintomas da doença. Devemos esclarecer, todavia, que esses ensaios com plantas de batatinha foram apenas preliminares, dependendo de confirmação posterior, o que pretendemos fazer quando tentarmos a transmissão do virus para membros de outras familias que não Solanaceas. Vejamos a seguir quais os sintomas que ocorreram em batatinhas:

a) var. *President* (suco) — Os sintomas só foram notados quatro semanas após inoculação, e consistiram de pontos e aneis necróticos pardos, sem um centro diferencial, na propria folha inoculada. As folhas novas não tinham manchas nas nervuras, porem mostravam alguns sinais necróticos duvidosos.

b) var. *Eigenheimer* (suco) — Placas cloróticas pequenas, circulares, com centro necrótico pardo-claro nas folhas medias, acima da folha inoculada.

c) var. *Bintje* (enxertia) — As folhas medias da haste enxertada, com 1 mês após a enxertia apresentavam placas cloróticas marginais e 1 mês após o aparecimento desses primeiros sintomas notava-se mosaico nas folhas novas.

d) var. *Bevelander* (suco) — Folha inoculada, sem sintomas. Cerca de 25 dias após inoculação, surge um mosaico nas folhas novas, e 3 semanas mais tarde as folhas medias e novas, acima da propria folha inoculada, apresentam mosaico, ondulamento do limbo e pequenos pontos necróticos pardos nas margens das folhas.

## PROPRIEDADES DO VIRUS

Depois que os resultados dos ensaios sobre a inoculação artificial provaram a possibilidade da transmissão experimental do virus da "Faixa das nervuras", foram feitas experiencias para determinar as propriedades desse virus. Estas experiencias consistiram em estudos de tolerancia á diluição, do ponto termal de inativação e da longevidade *in vitro*.

Tolerancia á diluição — O estudo desta propriedade fisica do virus foi levado a efeito com suco de plantas de fumo que mostravam sintomas acentuados da doença, quer dizer, plantas em cujas folhas a faixa escura das nervuras era bem aparente. Tais ensaios de diluição se processaram a partir de suco normal 1:1.

No quadro seguinte expomos os resultados desses ensaios de diluição. Pelos resultados conseguidos nos nossos ensaios, verifica-se que o virus da "Faixa das nervuras" se manifesta até em uma diluição de 1:500, ao passo que as indicações da literatura referentes ao virus Veinbanding e ao virus Y dão como limite extremo uma diluição de 1:1000.

TABELA 2

Influencia da diluição sobre a atividade do virus da "Faixa das nervuras"

| Plantas usadas | Inóculo | N.º de plantas | |
|---|---|---|---|
| | | Inoculadas | Infectadas |
| *N. tabacum* | | | |
| var. Havana. . . | normal 1:1 | 5 | 2 |
| | 1:10 | 3 | 3 |
| | 1:50 | 7 | 1 |
| | 1:100 | 3 | 1 |
| | 1:500 | 4 | 0 |
| | 1:1000 | 4 | 0 |
| var. White Burley | normal 1:1 | 3 | 3 |
| | 1:10 | 3 | 3 |
| | 1:50 | 7 | 3 |
| | 1:100 | 3 | 2 |
| | 1:500 | 4 | 3 |
| | 1:1000 | 4 | 0 |

Antes de entrar em detalhes sobre os resultados de nossas experiencias com diluição, devemos frizar aqui que o numero de plantas usadas, em cada um dos nossos ensaios, era relativamente pequeno, de maneira que devemos contar com uma variação relativamente grande dos resultados.

Comparando primeiro a suscetibilidade das variedades White Burley e Havana ás amostras diluidas do virus, podemos tirar a conclusão de que a primeira variedade reage com maior facilidade ao virus da "Faixa das nervuras" do que a variedade Havana, pois as plantas inoculadas da variedade White Burley ainda apresentaram sintomas quando inoculadas com gráos tão elevados de diluição que já não provocavam sintomas nas plantas correspondentes da variedade Havana. Além disso, tendo em vista o total das plantas inoculadas, a porcentagem das plantas infectadas foi sempre maior, em cada uma das series, na variedade White Burley do que na variedade Havana.

Poder-se-ia objectar que talvez esses resultados não sejam devidos exclusivamente á diferenças de variedades, mas tambem a diversidade de idade das duas variedades de fumo experimentadas. Devemos acentuar, porem, que as experiencias de diluição foram realizadas em tres épocas diversas, em 14/6, 5/8 e 18/9/1939 usando sempre, comparativamente, plantas das variedades citadas, de forma que essas diferenças, si existentes, se compensaram nos diversos ensaios feitos.

Quanto ao ponto final de diluição, foram conseguidos resultados, em White Burley, ainda em diluição de 1:500. Este resultado mostra que o virus da "Faixa das nervuras" só suporta diluições relativamente pequenas. Neste ponto o virus concorda com as caracteristicas dos virus do grupo Y, que conforme as indicações de KOEHLER (10) e K. M. SMITH (14) têm um ponto final de diluição proximo de 1:1000, e cuja atividade diminue rapidamente em diluições progressivas. SMITH, por exemplo, referindo-se ao ponto final de diluição do virus Y, diz que "a infectividade começa a decrescer rapidamente em diluições de 1:100 e que infecções positivas são apenas ocasionalmente obtidas em diluições de 1:1000". Dos resultados das nossas experiencias sobre a diluição podemos concluir, assim, pela existencia de uma similaridade entre o virus por nós pesquizado e os virus Y e o Veinbanding dos autores americanos.

Ponto termal de inativação — O estudo desta outra propriedade fisica do virus foi igualmente levado a efeito com suco normal 1:1 empregando, como já o dissémos, pequenos tubos de ensaio abertos, que eram mantidos em um banho-maria de temperatura controlavel.

Os resultados desses ensaios de inativação pelo calor, em numero de 8 e feitos respectivamente em 6/3, 5/8, 18/9, 1/12/1939, 3/1, 3/2, 9/2 e 6/3/1940 acham-se reunidos no quadro seguinte (tabela 3). Ve-

rifica-se, pelos dados experimentais, que a temperatura de inativação do virus da "Faixa das nervuras" fica proxima de 60° C. por 10 minutos de exposição, enquanto o virus Veinbanding dos autores americanos é inativado in vitro a 55° C.

TABELA 3

Temperatura de inativação pelo calor do virus da "Faixa das nervuras"

| Plantas usadas | Inóculo | N.º de plantas | |
|---|---|---|---|
| | | Inoculadas | Infectadas |
| *N. tabacum* | | | |
| var. Samsun . . . . | Suco normal sem tratamento | 14 | 9 |
| | Suco a 50° | 0 | 0 |
| | » » 55° | 6 | 1 |
| | » » 60° | 8 | 0 |
| | » » 62° | 6 | 0 |
| | » » 65° | 9 | 0 |
| var. Havana . . . . | » normal | 23 | 15 |
| | » a 50° | 4 | 0 |
| | » » 55° | 15 | 2 |
| | » » 60° | 20 | 0 |
| | » » 62° | 6 | 0 |
| | » » 65° | 9 | 0 |
| var. White Burley . . | » normal | 10 | 7 |
| | » a 50° | 4 | 2 |
| | » » 55° | 4 | 2 |
| | » » 60° | 9 | 2 |
| | » » 62° | 8 | 0 |
| | » » 65° | 8 | 0 |
| var. Kentucky. . . . | » normal | 2 | 2 |
| | » a 50° | 0 | 0 |
| | » » 55° | 0 | 0 |
| | » » 60° | 5 | 0 |
| | » » 62° | 5 | 0 |
| | » » 65° | 5 | 0 |

Dos ensaios reunidos nesta tabela 3, verificam-se as mesmas diferenças na suscetibilidade das diversas variedades de fumo, já demonstradas nos ensaios de diluição. Numa experiencia, em que o virus foi aquecido a 60°C., provocámos ainda infecção em plantas de White Burley, ao passo que plantas das variedades Samsun e Havana apenas

reagiram às inoculações com suco aquecido a 55°. Poder-se-ia citar tambem aqui que a var. White Burley não só indicou um ponto final de inativação mais elevado do que as outras variedades de fumo, mas deu sempre uma porcentagem muito maior de plantas infectadas em relação ao numero de plantas inoculadas.

Quanto à comparação do virus da "Faixa das nervuras" com os virus do grupo Y, do ponto de vista da inativação pelo calor, devemos dizer aqui que as indicações da literatura não são concordantes entre si.

O ponto termal de inativação do virus Y da batatinha foi determinado, por K. M. SMITH (14) como sendo de 52° C., e por E. KOEHLER (10) como superior a 55°. Já o virus Veinbanding inativa-se, conforme as indicações de JONES & VINCENT (7) a 55°; nas experiencias de K. L. KOCH (8) em 60° e nas de E. KOEHLER (10) a cerca de 50°. Todos esses autores concordam, então, em admitir um ponto termal de inativação compreendido entre 52° e 60° C. para estes virus, de fórma que o virus pesquisado por nós, do ponto de vista da sensibilidade ao aquecimento, pode ser incluido no grupo dos virus Y.

Longevidade "in vitro" — Os estudos da duração da atividade do virus, mantido no estado de suco na temperatura de laboratorio (15-17° C) foi efetuado com suco diluido a 1/10. Usámos suco diluido a 1/10 porque na ocasião da experiencia o suco normal tinha-se esgotado e, por outro lado, em experiencias anteriores já haviamos verificado que o suco em diluições fracas comportava-se como o proprio suco normal.

Durante a duração da experiencia, o suco foi conservado em ampolas esterilisadas, tendo-se acrescentado 0,15 cc. de uma solução a 5% de acido fénico para cada 2 cc. de suco, para sua conservação. Esta quantidade de liquido conservador corresponde aproximadamente a uma concentração de 0,35% de fenol puro.

Tais indicações para a conservação de virus pelo acido fénico baseiam-se no metodo proposto por R. G. HENDERSON (3) que aplica, nos seus estudos sobre a conservação do virus do *ring-spot* do fumo, uma solução de ácido fénico suficiente para obter uma concentração final de 0,25% de fenol puro.

Usando este metodo de conservação, realizámos uma serie de experiencias cujos resultados estão reunidos na Tabela 4. Nesta tabela, os dados estão organisados de tal maneira que os numeros acima do traço de fracção representam as plantas inoculadas e os numeros de baixo, as plantas infectadas. Verifica-se destes resultados que o virus da "Faixa das nervuras" permaneceu ativo no suco "in vitro" por periodo de 48 horas e que com 72 horas o virus contido no suco tornou-se inativo.

TABELA 4

Estudo da duração "in vitro" do virus da "Faixa das nervuras"

| Especie inoculada | Tempo de conservação (horas) | | | Inoc. controle |
|---|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 | |
| Havana . . . | 2/2 | 3/2 | 6/0 | 3/3 |

Todos os autores que realizaram estudos sobre a conservação, tanto do virus Y como do virus Veinbanding, são acordes em admitir uma resistencia relativamente pequena deles ao envelhecimento "in vitro". Todavia encontram-se discrepancias na literatura, a respeito do numero de dias necessarios á inativação do virus no suco expremido. K. M. SMITH (14), trabalhando com o virus Y, verifica uma inativação do suco, na temperatura de laboratorio, entre 24-36 horas. JONES & VINCENT (7) por sua vez, já conseguiram conservar o virus Veinbanding "in vitro", no estado ativo, durante 4-6 dias, e tambem K. L. KOCH (8), referindo-se a este ultimo virus, admite uma duração "in vitro", de cerca de 5 dias.

As nossas experiencias a este respeito dão assim a entender que o virus pesquisado tem um comportamento intermediario entre o dos virus mencionados. Baseados somente nessas experiencias não podemos determinar, porem, qual seria exatamente a verdadeira posição do nosso virus. Tal posição é estabelecida em conjunto com as outras propriedades desse virus na parte da Discussão, a seguir.

## DISCUSSÃO

Não obstante termos encontrado o virus no campo, em plantas de *Nicotiana tabacum*, var. Virginia, nenhum dos 12 *Nicotiana-virus* descritos por K. M. SMITH (14) corresponde, tanto nas qualidades como nos sintomas produzidos nas plantas inoculadas, ao virus por nós pesquisado. Pelo contrario, a lista das plantas hospedeiras por nós estabelecida, o caráter dos sintomas por elas apresentados e as propriedades físicas do virus não deixam a menor duvida quanto a dever o nosso virus pertencer ao grupo do virus Y das batatinhas. Os pontos principais que podem ser aludidos em favor da inclusão do nosso virus no grupo do virus Y, são os seguintes:

1.º) O sintoma principal, que foi produzido em quasi todas as plantas suscetiveis, consistia em faixas escuras ao longo das nervuras, sintoma caracteristico tambem para plantas inoculadas com o virus Y.

2.º) *Datura stramonium*, planta cuja falta de reação ao virus Y permite até usa-la como planta-filtro para a separação deste virus, dos outros virus que com ele constituem as doenças complexas das batatinhas, não apresentou igualmente sintomas quando inoculada com o virus da "Faixa das nervuras".

3.º) As qualidades físicas do virus contido no suco, isto é, a resistencia á diluição, ao aquecimento e á conservação "in vitro", estão dentro dos limites verificados por outros autores para os virus do grupo Y.

Diante desses fatos, trata-se somente de decidir com que representante dos virus do grupo Y a nossa forma de virus pode ser identificada.

Como já foi mencionado no Historico, foram descritos já tres tipos de doenças, todos eles causados por representantes do grupo Y, mas diferentes entre si, os quais poderiam corresponder ao virus por nós pesquisado. Trata-se aqui do virus Y propriamente dito, do virus Veinbanding e do virus P, caracterizados respectivamente por K. M. SMITH, por K. L. KOCH, J. JOHNSON e outros autores americanos, e por E. KOEHLER.

Antes de procurar definir a exata situação do nosso virus, convem frizar ainda uma vez quais as principais diferenças existentes entre estes 3 virus:

O virus Y é, das tres formas referidas, o mais forte, especialmente em plantas de batatinha. Conforme as indicações de DYKSTRA (2), tambem os sintomas produzidos em fumo e em *Capsicum* são mais pronunciados nas inoculações com o virus Y do que com o virus Veinbanding.

O virus Veinbanding dos autores americanos é, por sua vez, caracterizado geralmente por sintomas mais brandos do que os causados pelo virus Y. DYKSTRA (2), referindo-se ás diferenças produzidas pelos dois virus em plantas de fumo, é de opinião que a formação das faixas escuras nas nervuras, em consequencia da infecção pelo virus Y, é muito mais distinta do que na infecção pelo virus Veinbanding. Alem disso, este autor só em plantas de fumo inoculadas com o virus Y, observou um amarelecimento do limbo entre as nervuras. DYKSTRA tambem não conseguiu encontrar diferenças acentuadas nas propriedades físicas entre os dois virus em apreço. K. L. KOCH e J. JOHNSON (9) já haviam igualmente notado a semelhança entre os dois virus, quanto ás qualidades físicas, mas por outro lado observaram a suscetibilidade do *Solanum nigrum* ao virus Veinbanding, ao passo que a mesma especie se mostrou aparentemente imune ao virus Y nas suas experiencias.

Finalmente o virus P, de E. KOEHLER (10), comporta-se como uma forma enfraquecida de Y. No fumo da variedade Samsun este virus mostra, conforme KOEHLER, um fraco esclarecimento das nervuras, que posteriormente vem a desaparecer; este sintoma é seguido por um mosqueado delicado das folhas, que é caracterizado por uma ausencia completa de tonalidades amarelas. A este tipo de mosqueado, KOEHLER denomina "amostra de perolas".

Como outra peculiaridade do virus P, ainda o mesmo autor põe em destaque a inativação progressiva "in vivo" que este virus sofre em plantas de fumo da var. Samsun. Esta inativação foi por ele deduzida das dificuldades de transmissão do virus de Samsun para Samsun, dificuldades que não ocorreram quando foram usadas como fontes de infecção, plantas de batatinha. Esta inativação nunca foi constatada por ele nas inoculações com o virus Y ou o virus Veinbanding dos autores americanos.

Quanto ás propriedades físicas do virus, KOEHLER verificou ainda que o ponto termal da inativação do virus P situa-se proximo de 52°, isto é, mais ou menos 5° mais baixo do que o do virus Y.

Podemos agora comparar a forma estudada por nós com as tres fórmas acima referidas.

Frizamos, na descrição dos sintomas produzidos pela doença "Faixa das nervuras" em diferentes variedades de fumo, que todas as folhas doentes só apresentavam variações da tonalidade verde, sendo ora verde mais escuro, no caso das fitas das nervuras, ora verde mais claro, no caso do mosqueado. Confrontando estas observações com as indicações de DYKSTRA, antes referidas, que verificou um amarelecimento em folhas de plantas inoculadas com o virus Y, podemos excluir certamente a possibilidade da doença que estudamos ser causada pelo virus Y.

Ainda um outro argumento em favor da opinião de que o virus da "Faixa das nervuras" não é identico ao virus Y, reside nos resultados constantemente negativos das inoculações do nosso virus em plantas de *N. glutinosa*.

O virus Y provoca em plantas desta especie sintomas tão caracteristicos que é extranhavel que os outros autores não tenham feito maior uso de plantas de *N. glutinosa* para diferenciar o virus Y dos demais virus deste grupo. Os sintomas provocados pelo virus Y em *N. glutinosa* consistem no aparecimento simultaneo de listras claras e escuras ao longo das nervuras. A nervura mesma acha-se, muitas vezes, envolvida por uma larga listra clara, que é acompanhada em ambos os lados, por sua vez, pelas listras escuras. Muitas vezes tambem estas faixas escuras têm ainda bordos de linhas claras. Em experiencias

comparativas, realizadas por nós em 25/6/1940 com o virus da "Faixa das nervuras" e o virus Y, observamos os sintomas descritos exclusivamente nas plantas inoculadas com o virus Y. Este ultimo virus provocou ainda, alem dos sintomas descritos, uma inhibição do crescimento das plantas infectadas. Nas plantas de *N. glutinosa,* inoculadas com o virus da "Faixa das nervuras" não notámos, porem, como aliás já acima mencionamos, nenhum sintoma de doença. Diante desses resultados, pois, consideramos provado que o virus da "Faixa das nervuras" não é inteiramente idêntico ao virus Y.

Resta ainda comparar o nosso virus com o virus P, descrito por KOEHLER e o virus Veinbanding dos autores americanos.

Quanto ao virus P, este tem, sem duvida alguma, grande semelhança com o nosso virus no tocante aos sintomas produzidos em plantas de fumo. Observamos, nas nossas experiencias, muitas peculiaridades de sintomas já descritos por KOEHLER, tais como o mosqueado em forma de placas cloróticas (*amostra de perolas*) na variedade Samsun. Todavia, nas experiencias com o nosso virus, não pudemos observar a inativação "in vivo" em plantas da variedade Samsun, qualidade a que o referido autor atribue muita importancia. E' verdade, como se verifica no grafico 1, que a infecciosidade do nosso virus está sujeita a grandes variações, que causam ás vezes um insucesso nas repicagens sucessivas; mas para esta irregularidade não encontramos ainda uma explicação satisfatoria.

De nenhum modo, porem, este insucesso parece ligar-se exclusivamente ao uso de plantas da var. Samsun, pois, pelo contrario, nesta variedade o nosso virus ás vezes se manteve ativo em periodos de pelo menos 3 meses (vide grafico 1).

Mas tambem em alguns outros pontos, as qualidades do nosso virus não coincidem inteiramente com as do virus P. Achamos, por exemplo, o ponto de inativação termal do nosso virus cerca de 10° mais elevado do que o indicado por KOEHLER para o virus P. O mesmo autor tambem inclue a especie de *N. glutinosa* entre as plantas suscetiveis ao virus, enquanto as nossas inoculações feitas nesta especie com o virus da "Faixa das nervuras" não produziram, até agora, resultados positivos.

Concluimos portanto desta comparação, que o nosso virus tambem não coincide inteiramente com o virus P.

Com referencia, finalmente, ao virus Veinbanding dos autores americanos, este pode ser considerado, conforme a descrição de DYKSTRA, como forma atenuada do virus Y, pouco diferenciada deste ultimo virus em relação ás qualidades físicas. Verificamos o mesmo compor-

tamento para o virus por nós estudado e por isso o consideramos muito proximo do pesquisado pelos autores americanos. Não podemos infelizmente entrar numa comparação mais detalhada, porque a descrição dada por esse autor não aborda a questão de terem todos estes autores (VALLEAU & JOHNSON, JONES & VINCENT, KOCH & JOHNSON e DYKSTRA) trabalhado com formas perfeitamente identicas entre si e quais sejam as eventuais diferenças entre estas formas.

Todavia, a verificação, no Brasil, da ocorrencia do virus Veinbanding em plantas de fumo do campo, poderá esclarecer algumas questões de interesse prático e teórico. Mencionaremos aqui apenas um desses problemas, isto é, a questão de origem do virus observado. A esse respeito, o virus Veinbanding não deve pertencer aos virus frequentemente observados no Brasil em plantações de fumo pois, apezar do grande numero de inoculações já realizadas por nós com suco de plantas de fumo, nunca observámos, até hoje, a ocorrencia desta doença em plantações de fumo. E' provavel, por isso, que a doença se tivesse disseminado para o fumo, a partir de uma plantação visinha, de batatinha.

Fala em favor desta hipotese a indicação de KOCH & JOHNSON (9), que verificaram a ocorrencia do virus Veinbanding em batatinhas de origem brasileira. Parece, pois, que no Brasil se encontra o virus Veinbanding em batatinha.

Em vista disso, dá-se portanto aqui o caso interessante de se encontrarem no mesmo país e provavelmente na mesma zona, 2 virus do mesmo grupo, mas que são bem distintos entre si. Procurando, num futuro proximo, o esclarecimento das relações imunológicas entre esses 2 virus, pretendemos realizar na mesma ocasião estudos sobre a relativa frequencia e a distribuição geografica desses dois virus em batatais no Estado de S. Paulo e sobre o eventual efeito protetivo da infecção de batatinhas com o virus Veinbanding, para prevenir contra o ataque ulterior pelo virus Y. Esperamos poder relatar dentro em breve os resultados desses ensaios.

## RESUMO E RESULTADOS PRATICOS

Este trabalho apresenta os resultados do estudo de uma doença de virus, verificada pela primeira vez em plantas de fumo, nas condições do Estado de S. Paulo. Observamos essa doença num campo de experimentação do Instituto Biologico, localisado nos terrenos do Horto Florestal (S. Paulo).

Nesse campo, onde havia duas fileiras de 50 plantas cada uma, a doença só apareceu em 7 plantas do fim de uma dessas fileiras, proximo de um campo onde anteriormente tinham crescido batatinhas.

Nos estudos de transmissão experimental da doença, foi constatado, desde logo, que se tratava, aqui, de uma doença com as caracteristicas das doenças de virus das batatinhas ou melhor, de uma doença do grupo do virus Y das batatinhas.

As diferenças com o virus Y residiam na falta de produção de sintomas em *Nicotiana glutinosa*, na manifestação de sintomas mais brandos em diversas variedades de batatinhas e na ocorrencia de faixas escuras, largas e bem definidas nas nervuras das folhas, nas variedades comerciais de *Nicotiana tabacum.*

Devido a essas diferenças e ás qualidades do suco "in vitro", admitimos que o virus estudado por nós concorda mais estreitamente com o virus Veinbanding dos autores americanos.

A ocorrencia natural da doença que estudamos, em plantas de fumo, mostra afinal a possibilidade, aliás já focalizada tambem por W. D. Valleau, E. M. Johnson e T. P. Dykstra, de sob certas condições, as Solanaceas selvagens ou o proprio fumo crescendo nas proximidades de batatinhas poderem tornar-se infectados com as doenças de virus desta ultima cultura, e servir assim, por sua vez, como fontes de infecção.

Esta questão deve pois ser levada em consideração entre nós na luta contra doenças de virus de batatinha, sendo de conveniencia verificar agora, no Estado de S. Paulo, a frequencia de plantas de fumo e de Solanaceas selvagens que estejam atacadas pela referida doença "Faixa das nervuras".

## A VIRUS-DISEASE OF THE TOBACCO, NAMED "FAIXA DAS NERVURAS", FOUND IN THE STATE OF SÃO PAULO

### *Abstract*

*1) Among tobacco plants, cultivated for experimental purposes, we found 7 plants distinguished by a weak mottling in form of chlorotic spots of the leaves. The experiments about the transmissibility of this disease by sap and by grafting are described in this paper.*

*2) In artificial sap inoculations, the virus produced pronounced veinbanding on the varieties Havana, White Burley, Kentucky, Sumatra, Samsun and Amarelo Rio Grande of Nicotiana tabacum, faint mottling on N. langsdorffii, mottling and short*

*veinbanding on N. rustica, gave negative results on N. glutinosa and Datura stramonium and negative or doubtful results on Solanum nodiflorum and Petunia hybrida.*

*3) The virus was transmitted by sap as well as by grafting to the potato varieties President, Bintje, Eigenheimer and Bevelander. President developed necrotic spots and necrotic rings on the inoculated leaves, Bintje showed chlorotic spots and mottling on the middle leaves, Eigenheimer presented only minute chlorotic spots with necrotic center on the middle leaves and Bevelander showed a faint mottle on the younger leaves.*

*4) On account of the results of our experiments and of the references of the literature we include the virus responsible for the disease, named by us "Faixa das nervuras", in the group of the Y virus of potato. Its characteristics are very similar to those of the "Veinbanding-virus" of the american authors.*

## BIBLIOGRAFIA


1 — Dykstra, T. P. — 1936 — Comparative studies of some European and American potato viruses. *Phytopath.*, 26, 597-606.

2 — Dykstra, T. P. — 1939 — A study of viruses infecting European and American varieties of the potato, Solanum tuberosum. *Phytopath.*, 29, 40-67.

3 — Henderson, R. G. — 1933 — Increasing the resistance of tobacco ring-spot virus to aging in vitro by use of carbolic acid. *Phytopath.*, 23, 14-15.

4 — Holmes, F. O. — 1934 — Inheritance of ability to localise tobacco-mosaic virus. *Phytopath.*, 24, 984-1002.

5 — Johnson, E. M. — 1935 — An example of spread of Veinbanding from potatoes to tobacco. *Phytopath.*, 25, 650-652.

6 — Johnson, J. — 1936 — A Tobacco hybrid useful for virus studies. *The American Journal of Botany*, 23, 40-46.

7 — Jones, L. K. and C. L. Vincent — 1937 — The susceptibility of potatoes to the Vein-banding virus. *Journ. Agr. Res.*, 55, 69-79.

7 a — Jones, L. K., C. L. Vincent & Earl F. Burk — 1940 — The resistance of progeny of Katahdin potatoes to viroses. *Jour. Agr. Res.*, 60, 631-644.

8 — Koch, K. L. — 1933 — The nature of potato rugose mosaic. *Phytopath.*, 23, 319-342.

9 — Koch, K. L. and J. Johnson — 1935 — A comparison of certain foreign and American Potato viruses. *Ann. Appl. Biol.*, 22, 37-54.

10 — Koehler, E. — 1937 — Über ein "Veinbanding-Virus" der Kartoffel. *Phytopath. Zeitschr.*, 10, 17-29.

11 — Kostoff, D. — 1937 — Cytogenetic aspects for producing *Nicotiana tabacum* forms localizing tobacco mosaic virus. *Phytopath. Zeitschr.*, 10, 578-593.

12 — MURPHY, P. A. — 1935 — Identity and spread of some potato viruses of the mosaic group. *Proceedings of the Zesde Intern. Bot. Congress.*, Amsterdam, 2, 198-199.

12 a — MURPHY, P. A. & R. MCKAY — 1932 — A comparison of some European and American virus diseases of the Potato. *Sci. Proc. R. Dublin Soc.*, 20 (N. S.), 347-358.

12 b — MURPHY, P. A. & J. B. LOUGHNANE — 1936 — A comparison of some Dutch and Irish Potato Mosaic viruses. *Sci. Proc. R. Dublin Soc.*, 21 (N. S.), 419-430.

13 — SMITH, K. M. — 1931 — Composite nature of certain Potato viruses of the mosaic group. *Nature*, 127, 3214, 702.

14 — SMITH, K. M. — 1937 — A Textbook of Plant Virus Diseases. 615 pp., Churchill Ltd. edit., London.

15 — VALLEAU, W. D. & E. M. JOHNSON — 1928 — Some virus diseases of tobacco in Kentucky. Abs. in *Phytopath.*, 18, 132-133.

16 — VALLEAU, W. D. & E. M. JOHNSON — 1930 — The relation of some Tobacco viruses to Potato degeneration. *Kentucky Agric. Exp. Stat. Bull.*, 309, 475-507.

———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 39

Figs. *A* e *B* — Folhas de *Nicotiana tabacum*, da variedade Virginia, de plantas naturalmente infectadas com a doença "Faixa das nervuras", mostrando linhas amarelas curtas acompanhando em parte as nervuras. Este é o sintoma tardio da fonte de infecção usada nas nossas experiências.

Fig. *C* — Folha media de *N. tabacum* var. Samsun, inoculado com o suco prensado de folhas da fonte de infecção, mostrando fitas escuras das nervuras e amostra de perolas.

### Estampa 40

Fig. *D* — Folhas medias de *N. tabacum*, var. Kentucky: a) folha sadia e b) sintomas iniciais, sistemicos, na forma de um esclarecimento intenso das nervuras.

Fig. *E* — Em a) folha media de *N. tabacum*, var Sumatra, com sintomas sistemicos de linhas escuras das nervuras; em b) folha media de *Nicotiana rustica*, com as faixas escuras curtas, das nervuras, junto ás margens das folhas.

Fig. *F* — Folhas medias de *Nicotiana langsdorffii*, com sintomas sistemicos de um mosqueado fraco, como placas cloroticas de centro mais escuro.

### Estampa 41

Figs. *G* e *H* — Folhas medias de *N. tabacum*, var. Havana, mostrando as faixas escuras largas, tipicas, das nervuras, em toda a superficie do limbo ou disseminando-se da base para a parte apical da folha.

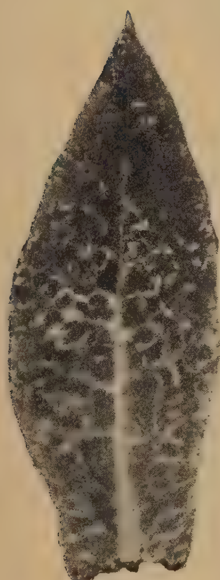
Fig. *I* — Folha nova de *N. tabacum* White Burley, igualmente com fitas escuras, bem nitidas, das nervuras.

Fig. *J* — Folhas medias de *Nicotiana sylvestris*, mostrando infecções comparativas por virus Y (*y*) e pelo virus da "Faixa das nervuras" (*v*): linhas claras das nervuras e placas claras circulares com o virus Y e linhas claras nitidas com o outro virus. Os pontinhos escuros, que se notam nas folhas, são causados apenas pela invasão posterior de um fungo.

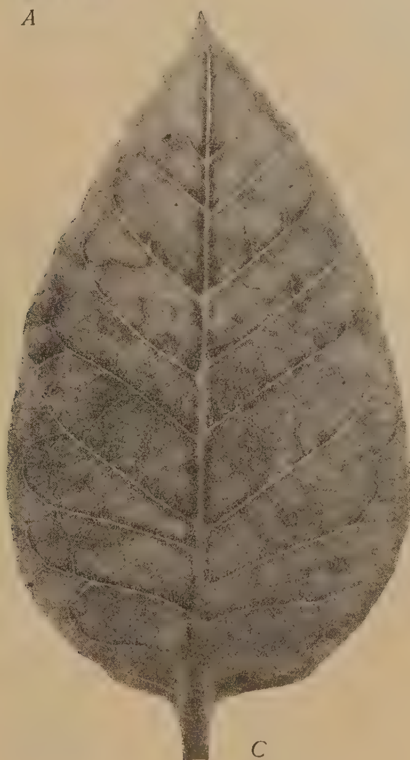
———o———



*A*



*B*



*C*

# SIMULIDEOS DA REGIÃO NEOTROPICA
## III * - DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPECIES DOS GÊNEROS "SIMULIUM" E "EUSIMULIUM"

POR

John Lane e Carlos E. Porto

Do Instituto de Higiene de S. Paulo

Com 16 figuras no texto

Na presente contribuição descrevemos cinco espécies novas. Estas foram encontradas nas coleções a que nos referimos em nossa primeira nota. Incluimos tambem a descrição e desenhos da terminalia de *Simulium incrustatum* LUTZ, 1910.

Em trabalho futuro, óra em elaboração por um de nós, será incluida uma chave para o gênero *Simulium* s. str., bem como a bibliografia consultada até o presente.

Consideramos *Eusimulium* ROUBAUD como bom gênero. Colocamos quatro das espécies que hoje descrevemos no gênero *Simulium* pois este concorda em quasi todos os seus caracteristicos com a definição que EDWARDS (1931) apresenta em "Diptera of Patagonia and South Chile".

### *Eusimulium antunesi*, n. sp. (Fig. 1)

Assemelha-se a *Eusimulium perflavum* ROUBAUD, do qual se distingue pela côr do mesonôto e área ocular.

Fêmea — Comprimento do corpo 2,8 mm.; aza 3 mm.

Cabeça — Palpo e partes bucais negro-avermelhadas; clipeo enegrecido, pruinoso, fronte com carêna mediana, da côr do clipeo; ocipicio enegrecido com pruinosidade branca e cerdas desta côr; area ocular (fig. 1); antêna de côr avermelhada.

Torax — Lóbo protoracico com reflexos prateados; mesonôto com tegumento amarelado e manchas escuras irregulares e laterais; tomento de côr dourada, nota-se lateralmente uma tarja amarelada; escutelo com tegumento amarelo e orla posterior de cerdas; o tomento é da côr do mesonôto mas se dispõe em sentido transversal; metanôto esbranquiçado; pleuras com areas negras e regiões claras, um tufo de cerdas no episterno protoracico; abdomen enegrecido, revestido de cerdas esbranquiçadas.

Haltéres com haste palida.

Patas — Fêmures e tibias com tegumento castanho, exceto no ultimo par, em que o ápice da tibia é negro, revestido de pilosidade dourado-palida; 1.° par com tarsos negros; 2.° par com o ápice do basitarso, 2.° tarso e demais articulos enegrecidos; 3.° par semelhante ao 2.° porem com as areas escuras de coloração mais carregada; garras com engrossamento basal.

---

* I — Simulídeos da região neotrópica. *Bol. Biológico*, S. Paulo, Vol. IV (nova série) pp. 168-176, Maio 1939.
II — *Idem*, *Bol. Biológico*, S. Paulo, Vol. IV (nova série) pp. 369-373, Setembro 1939.

Tipos — Holotipo fêmea; paratipos duas fêmeas. Depositados na coleção do Instituto de Higiene de S. Paulo sob os numeros 1.264, 1.265 e 1.323.

Localidade tipo — Pirajá, Baía, 13-VI-35 (P. C. A. ANTUNES col.).

Observações — Esta especie foi capturada com isca animal. Temos o prazer de dedica-la ao nosso amigo Dr. P. C. A. ANTUNES, que a colecionou.

## *Simulium pilosum*, n. sp. (Figs. 2-5)

Caracterisa-se pelo tomento denso que reveste o mesonôto e coloração clara das patas.

Fêmea — Comprimento do corpo 2,2 mm.; aza 2,5 mm.

Cabeça — Palpo e proboscida enegrecidos com pilosidade esbranquiçada; fronte e ocipicio negros com pilosidade prateada; antenas de côr avermelhada.

Torax — Lóbo protorácico enegrecido; mesonôto de fundo negro, cortado longitudinalmente por três linhas que divergem posteriormente; destas, a mediana é fina, ao passo que as laterais são grossas; tomento muito denso e difuso, de côr prateada, mais esparso na região pré-escutelar; escutélo com fileira posterior de cerdas pálidas e o tomento disposto transversalmente e de coloração semelhante á do mesonoto, porém com as escamas mais compridas; metanôto glabro e enegrecido; pleuras negras, pruinosas e com um unico tufo de cerdas pálidas no episterno mesotorácico; abdomen com faixas basais mais escuras e de côr enegrecida, possuindo pilosidade negra escassa e de côr pálida nos segmentos terminais.

Haltéres esbranquiçados.

Patas — 1.º par branco-amarelado, tarsos negros; 2.º par esbranquiçado mas com uma fileira de cerdas negras no basitarso e 2.º tarso, este ultimo enegrecido no ápice, 3.º, 4.º e 5.º tarsos enegrecidos; 3.º par amarelado, a tibia com extremidade distal negra, basitarso com uma linha negra interna e ápice enegrecido, 2.º tarso com a metade basal enegrecida, os demais segmentos negros; garras tarsais (vide fig. 5) com pequeno dente. Não foi possivel vêr a garra tarsal do par mediano.

Tipos — Holotipo fêmea; paratipos seis fêmeas. Depositados na coleção do Instituto de Higiene de S. Paulo sob os numeros 1.316 e 1.348 a 1.350. Um dos exemplares está montado entre lamina e laminula.

Localidade tipo — Ponce, Chapada, Mato Grosso (600 mts. de altitude), VIII-34 (S. F. A. col.).

Localidades adicionais — Temos uma fêmea de Cambará, Paraná, 24-VII-36 (S. F. A. col.).

Observações — O material supra foi capturado com isca humana.

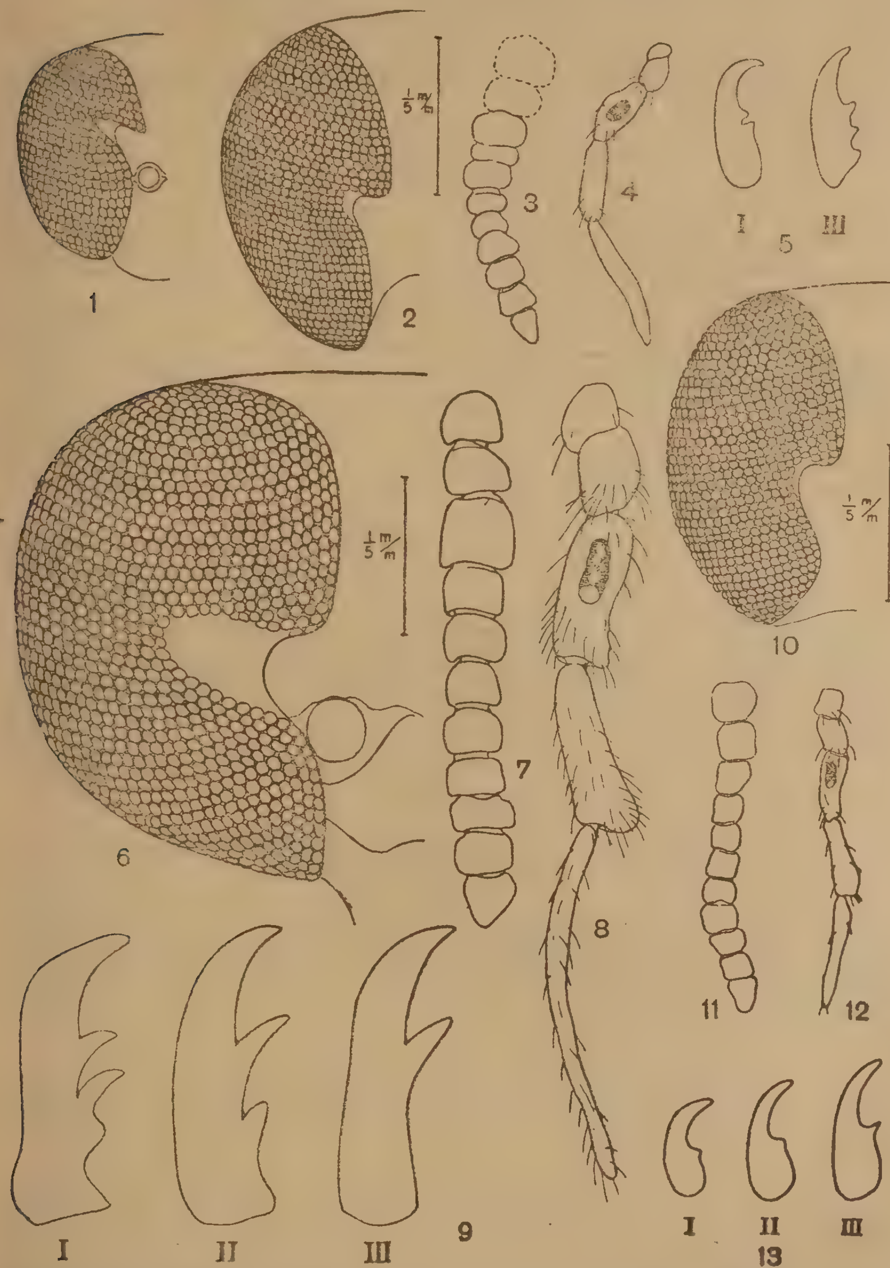



Fig. 1 - *Eusimulium antunesi*, n. sp. ♀ - Área ocular frontal. Fig. 2-5 - *Simulium pilosum*, n. sp. ♀ - Fig. 2 - Área ocular frontal; Fig. 3 - Antena; Fig. 4 - Palpo; Fig. 5 - Garras tarsais. Figs. 6-9 - *Simulium major*, n. sp. ♀ - Fig. 6 - Área ocular frontal; Fig. 7 - Antêna; Fig. 8 - Palpo; Fig. 9 - Garras tarsais. Figs. 10-13 - *Simulium scutellatum*, n. sp. ♀ - Fig. 10 - Área ocular frontal; Fig. 11 - Antêna; Fig. 12 - Palpo; Fig. 13 - Garras tarsais.

## *Simulium major*, n. sp. (Figs. 6-9) [1]

Caracterisa-se pelo grande porte e semelhança com *Eusimulium rubrithorax* LUTZ, 1909.

Fêmea — Comprimento do corpo 3-4 mm.; aza 3,5 a 4,5 mm.

Cabeça — Palpo e partes bucais castanho-escuros; clipeo piloso castanho; fronte larga, divergindo em direção ao occipicio com pilosidade negra e pruina branca; antêna com os segmentos basais mais claros e os restantes castanhos e pruinosos; área ocular fortemente reintrante; occipicio pruinoso, com densa pilosidade negra e uma orla de cerdas marginando os olhos.

Torax — Lóbo protorácico castanho, com densa pilosidade dourada e algumas cerdas negras; mesonôto quadrangular, avermelhado, pruinoso, com três linhas longitudinais mais escuras, a mediana mais estreita e alcançando até a área pré-escutelar; o revestimento é de tomento esbranquiçado difuso; escutelo mais escuro com escamas transversais semelhantes ás do mesonôto; metanôto pruinoso; pleuras glabras, avermelhadas, pruinosas, com três ou quatro cerdas negras no episterno mesotorácico; abdomen enegrecido, tergitos mais claros medianamente.

Haltéres com haste escurecida e capitulo mais claro.

Patas — Fêmures e tibias castanhos em todos os pares com densa pilosidade dourada; tarsos anteriores enegrecidos; basitarsos e dois primeiros tarsos medianos, claros, com anel distal enegrecido, demais segmentos enegrecidos; par posterior semelhante ao mediano; garras tarsais (vide fig. 9).

Tipos — Holotipo fêmea; paratipos treze fêmeas. Depositadas na coleção do Instituto de Higiene de S. Paulo sob os numeros 1.324 á 1.332.

Localidade tipo — Ponce, Chapada, Mato Grosso (600 mts. de altitude) VIII-34 (J. LANE col.).

Localidades adicionais — Inhumas, Goiaz (S. F. A. col.); Avaré, S. Paulo (LANE & ANDRADE col.).

Observações — O material de Mato Grosso foi colhido á tarde, sobre a barriga de equideos, juntamente com exemplares de *Eusimulium rubrithorax* LUTZ, 1909. Esta especie é uma das maiores do genero *Simulium* até agora descritas.

## *Simulium scutellatum*, n. sp. (Figs. 10-13)

Exemplares de pequeno porte, coloração geral amarelada. Escutelo amarelo e saliente.

Fêmea — Comprimento do corpo 1,2 mm.; aza 1,5 mm.

Cabeça — Palpo e partes bucais castanho-escuros; clipeo, fronte e occipicio negros com pruinosidade branca e pilosidade negra; antêna com os três primeiros segmentos amarelados e mais engrossados, os demais, enegrecidos e com pruinosidade branca.

Torax — Lóbo protoracico bem desenvolvido, amarelo, com escassa pilosidade; mesonôto amarelado, com marcações irregulares vermelho-escuras e que

---

1 Na chave apresentada por C. E. Porto (Rev. Mus. Paul., 24:383) esta espécie saíu com o nome de *magnus*.

variam de um espécimen para o outro; tomento anteriormente branco e negro na parte posterior; observam-se duas manchas longas branco-prateadas e anteriores em certas incidencias de luz, principalmente quando se focalisa o espécimen com o mesonôto em posição vertical; escutelo bem desenvolvido e de coloração amarela (em muitos exemplares é protuberante e ponteagudo); metanôto glabro; pleuras uniformemente castanhas; episterno mesotorácico com algumas cerdas negras; abdomen marron com pilosidade de côr negra.

Haltéres com haste escura e capitulo avermelhado.

Patas — 1.º par: fêmures castanho-claros com reflexos acobreados; tibias e tarsos negros; 2.º par como no par anterior, apenas as tibias mais claras; 3.º par com os fêmures mais escuros que no par anterior; garras tarsais (vide fig. 13).

Tipos — Holotipo fêmea; paratipos desesseis fêmeas. Depositados na coleção do Instituto de Higiene de S. Paulo sob os números 1.317 e 1.336 á 1.347.

Localidade tipo — Restrepo, Colombia, 6-I-35 (S. F. A. col.).

Localidade adicional — Juquiá, S. Paulo, Brasil, XI-38 (J. Lane col.).

Observações — Todos os espécimens capturados com isca humana. E' surpreendente a distribuição geografica e acreditamos por óra que seja uma unica espécie. Ha no entanto a possibilidade de estudos futuros mostrarem diferenças morfológicas em outras fases do ciclo evolutivo e que revelem tratar-se de duas espécies.

## *Simulium albopictum*, n. sp.

Caracterisa-se pelos tufos de cerdas brancas no mesonôto, alem de outros detalhes.

Fêmea — Comprimento do corpo 1,5 mm.; aza 2 mm.

Cabeça — Proboscida avermelhada e palpo negro; clipeo e fronte negros, com grupos de escamas esbranquiçadas e raros pêlos negros; occipicio negro com orla de cerdas negras e posteriormente a estas, escamas esbranquiçadas.

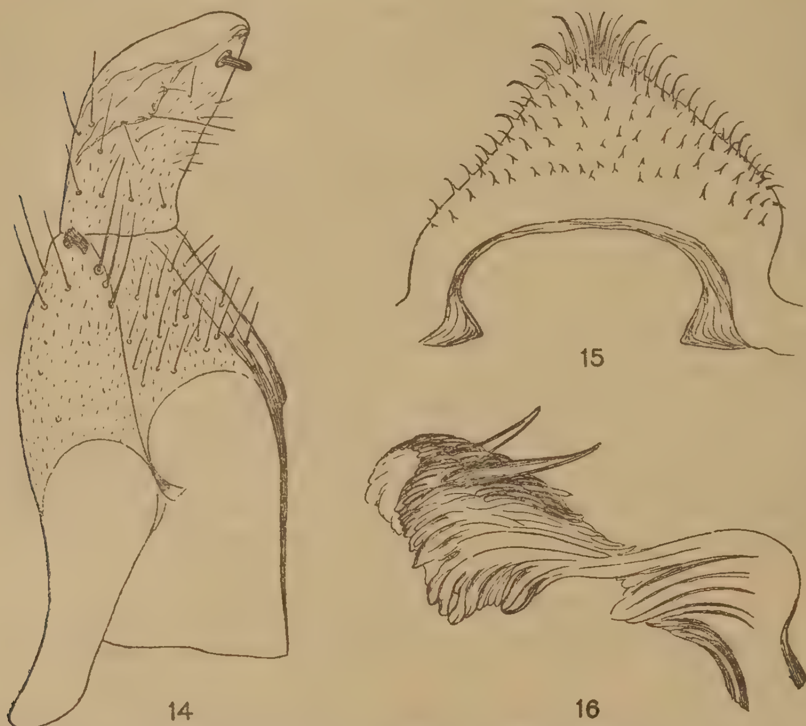
Torax — Com tegumento negro. Lóbo protorácico com escamas longas e branco-amareladas; mesonôto revestido por feixes de escamas esbranquiçadas excéto a area pré-escutelar em que essas escamas são difusas; escutelo com uma fileira de cerdas negras no rebordo posterior e escamas brancas em sentido transversal; pleura pruinosas, com um tufo de cerdas no episterno mesotorácico; abdomen negro com cerdas esbranquiçadas.

Haltéres com haste enfuscada e capitulo branco.

Patas — 1.º par com fêmur castanho, tibia enegrecida e anteriormente esbranquiçada; tarsos negros; 2.º par com fêmur esbranquiçado excéto o ápice que é enegrecido; tibia enegrecida com escamas brancas, basitarso branco com ápice negro e uma linha interna de cerdas negras, os demais segmentos negros; 3.º par, fêmur castanho, tibia com os dois terços apicais enegrecidos e escamas brancas que revestem estes orgãos; tarsos como no 2.º par.

Tipos — Holotipo fêmea; paratipos duas fêmeas. Depositados na coleção do Instituto de Higiene de S. Paulo sob os números 1.351 e 1.352.

Localidade tipo — Cambará, Paraná, 29/30-VII-36 (S. F. A. col.).




*Simulium incrustatum* LUTZ, 1910 ♂ — Fig. 14 - Peça lateral e pincêta. Fig. 15 - Mesosoma. Fig. 16 - Peça lateral acessoria.

*Simulium incrustatum* LUTZ, 1910 (Figs. 14-16)

Conseguimos capturar com rêde dois ♂♂ desta espécie, em Osasco, São Paulo. Damos abaixo a descrição da terminalia:

Terminalia — (Figs. 14, 15 e 16). Peça lateral lévemente cônica, com fortes e numerosas cerdas e pilosidade densa; pincêta com espiculo grosso, rômbo, pre-apical interno e cerdas e pilosidade como na peça lateral; mesosoma de forma triangular, densamente espiculoso e com cerdas longas e curvas no ápice, que dão a esta estrutura a aparencia de topéte; placa acessoria fortemente enrugada e com dois filamentos.

Observações — Esta espécie tem a terminalia semelhante ao *Simulium catharinensis* PINTO, 1931, mas póde ser facilmente separada por detalhes do mesosoma e da placa acessoria.

Desejamos agradecer á Fundação Rockefeller e ao Serviço Federal de Fébre Amarela o excelente material que nos cederam para estudo. Os paratipos não mencionados neste trabalho serão devolvidos á Fundação Rockefeller.

Agradecemos tambem ao Sr. Salvador Albani a execução dos desenhos que ilustram o presente trabalho.

## NEOTROPICAL SIMULIDAE

### III — DESCRIPTION OF NEW SPECIES TO THE GENERA "SIMULIUM" AND "EUSIMULIUM"

*Abstract*

*The AA. describe five new species of Neotropical Simulidae of which one belongs to the genus Eusimulium and four to the genus Simulium s. str. Of these species four occur in Brazil and one in Colombia. They also include a description of the terminalia of Simulium incrustatum* LUTZ, *1910.*

———o———

# ANALISI CROMATOGRAFICA DI ALCUNI POLISACCARIDI

DI

Prof. Dott. Giorgio Renato Levi
Chimico Consultore della I. R. F. Matarazzo, S. Paulo

E' evidente che per uno studio di questo genere il solvente più adatto appare a priori l'acqua; come solventi eluanti, oltre l'acqua stessa, possono essere usati liquidi di caratteristiche solventi simili ad essa ed in effetto, come si dirá più avanti, ho riscontrato utile l'uso di glicerina.

Più difficile è stabilire l'uso del mezzo adsorbente adatto, perchè qui sostanzialmente si procede per tentativi. Inulina, zucchero di canna e di latte, più recentemente cotone, sono stati usati come adsorbenti, ma non fanno al nostro caso per la loro natura organica e comportamento con acqua. Anche fra quelli inorganici bisogna avere qualche criterio di scelta; in genere quelli fortemente attivi (per es. per la loro natura fortemente acida o basica) non sono adatti e così dicasi per quelli del tutto inerti.

Per ciò che riguarda la tecnica sperimentale di queste ricerche rimandiamo all'ottimo libro di ZECHMEISTER e CHOLNOKY "Die Chromatographische Adsorptionsmethode" di cui abbiamo avuto una seconda edizione nel 1938 e ai precedenti lavori dell'autore in argomento (1).

Così pure non è possibile richiamare, anche brevemente, le cognizioni attuali sulle sostanze esaminate per le quali abbiamo anche libri speciali in argomento. Il lettore troverà un riassunto sufficiente ed aggiornato, per quanto riguarda l'interpretazione di queste ricerche, nel GRIGNARD (2).

Ho usato sempre tubi di vetro *uviol* per i diversi cromatogrammi in modo di poter disporre, in caso di utilità, della luce di Wood.

---

Prove preliminari sull'amido: Una quantitá pesata di adsorbente viene posta nel tubo cromatografico; attraverso ad essa si fa filtrare una quantitá dieci volte superiore (così fissata puramente a scopo di riferimento) di soluzione, a concentrazione nota;

(1) G. R. LEVI e A. GIERA — Cromatografia degli acetati di cellulosa. Gazzetta Chimica Italiana 67: 719 (1937). G. R. LEVI e F. CASTELLI — Studio cromatografico degli alcaloidi dell'oppio. Gazzetta Chimica Italiana 68: 459 (1938). G. R. LEVI e G. P. CAJELLI — Cromatografia de soluções de Borracha. Revista Brasileira de Chimica, Setembro e Outubro de 1939.

(2) GRIGNARD — Traité de Chimie Organique VIII fasc. 2.° pg. 617 e seg.

si lava con ugual volume di solvente, poi si estrae la colonna adsorbente. Questa viene suddivisa in vari cilindretti, di altezza presso a poco costante e, a sua volta, ogni cilindretto viene diviso per metà. L'una si sbatte con acqua, e si osserva la reazione con soluzione di iodio, l'altra viene trattata con opportuno mezzo eluante, si filtra, si lascia raffreddare e si saggia con iodio. L'aggiunta di acqua di iodio è bene sia costante per poter osservare la variazione circa l'intensitá e la punta di colore data dagli strati successivi. Dopo alcuni saggi intesi a trovare un opportuno mezzo adsorbente, l'eluazione veniva preceduta dall'osservazione alla luce di Wood.

Si sono eseguite prove dapprima sull'amido, usando l'amido solubile di ZULKOWSKY, poi amido naturale, indi glicogeno, destrina, inulina, sia soli, sia in miscela con amido solubile e naturale.

La tabella seguente concerne una serie di prove fatte sull'amido:

| Peso adsorbente | Sostanza adsorbente | Quantità e qualità della soluzione | Mezzo eluante | Adsorbimento |
|---|---|---|---|---|
| Gr. 40 | Terra follone V. A. C. Litacrom | 400 cm.$^3$ soluzione amido di Zulkowsky al 50%$_0$ | Acqua bollente | Totale |
| Gr. 40 | Terra follone Caffaro M. A. C. Litacrom | » » » | » | Totale |
| Gr. 40 | $CaCO_3$ prec. | » » » | » | Totale |
| Gr. 40 | Ca $F_2$ prec. | » » » | » | Nullo |
| Gr. 40 | Al $(OH)_3$ Merck | » » » | » | Nullo |
| Gr. 40 | $SiO_2xH_2O$ (ac. Silicico prec.) | » » » | » | Nullo |
| Gr. 40 | $CaSO_4$ prec. | » » » | » | Nullo |
| Gr. 40 | MgO leggero | » » » | » | Totale |
| Gr. 40 | $MgCO_3$ bas. prec. | » » » | » | Nullo |
| Gr. 15 | Carbone animale Merck | 150 cm.$^3$ » » | Glicerina | Totale |
| Gr. 15 | Carbone veg. Appula | » » » | » | Totale |

L'adsorbimento è totale in caso di reazione negativa del filtrato con iodio. Dalle prove precedenti possiamo dedurre:

a) Le due terre sono dotate di potere adsorbente elevatissimo poichè l'amido è completamente adsorbito nelle prime porzioni della colonna, e perciò non sono adatte.

b) Nessuna osservazione, oltre ai dati della tabella, circa $CaCO_3$, $CaF_2$, Al $(OH)_3$, $SiO_2$, $CaSO_4$.

c) L'ossido di magnesio puro in polvere leggera è risultato il più idoneo tra gli adsorbenti provati; presenta una buona affinitá

per l'amido, che si può poi eluare completamente per trattamento con acqua bollente. Bisogna però osservare la precauzione di fare il cromatogramma alla temperatura ambiente per evitare l'idratazione dell'ossido.

All'eluazione gli strati superiori dànno la reazione caratteristica dell'amido; si arriva poi ad uno strato (la cui distanza dalla parte superiore della colonna è in dipendenza dalla quantitá della soluzione filtrata) dal quale si ottiene una colorazione che varia dal rosso violaceo al rosso vivo. Dalle prove fatte si è potuto dedurre che la variazione della punta di colore verso il violaceo è la risultante del colore azzurro dato dall'amido con quello dello iodio in eccesso dove l'amido è in quantità sempre minore.

d) $MgCO_3$ basico, anche di fresco precipitato dal bicarbonato si è dimostrato del tutto inattivo.

e) Tanto il carbone animale di Merck, quanto quello vegetale "Appula" sono dotati di notevolissima attività ed entrambi fissano l'amido adsorbito con grande forza, tanto che l'acqua bollente non ha più azione eluante. Per individuare l'amido adsorbito si può idrolizzarlo a glucosio, bollendo la colonna di carbone con acido minerale diluito, filtrare, neutralizzare, e vedere la riduzione al liquore di Fehling.

Si è provato come eluante la glicerina, sia pura, sia in soluzione concentrata; effettivamente per riscaldamento a bagno maria, per la durata di mezz'ora, essa asporta l'amido in parte e dà netta la reazione con acqua di iodio.

Determinato così l'adsorbente ossido di magnesio come il più adatto si è continuato lo studio, facendo precedere all'eluazione l'osservazione alla lampada a raggi ultravioletti, onde notare il comportamento della fluorescenza rispetto l'intensità e il colore.

All'osservazione semplice in tubo Uviol in cui si sono messi dei campioni dei seguenti amidi in polvere: riso, frumento, mais, Zulkowsky, solubile Merck, inulina, oltre a glicogeno e destrina, si nota:

1) Gli amidi danno fluorescenza azzurra, la cui intensità decresce secondo l'ordine nel quale sono stati scritti, essendo però: riso = frumento; mais = solubile Zulkowsky = solubile Merck.

2) L'inulina dà una fluorescenza azzurra debolissima.

3) Il glicogene appare di un bianco brillante.

4) La destrina dà fluorescenza biancastra.

Dei supporti si sono osservati il carbone e l'ossido di magnesio. Il primo non dà nessuna fluorescenza nè secco nè umido; l'ossido di

magnesio in polvere, secco, è assolutamente inattivo ai raggi ultravioletti, acquista invece una fluorescenza azzurra, appena percettibile, allo stato umido.

Le prove sotto indicate sono state fatte su scala più ridotta delle precedenti essendosi usati tubi uviol.

| Peso adsorbente | | Sostanza adsorbente | Soluzioni 1 % filtrate |
|---|---|---|---|
| a | gr. 15 | Carbone anim. Merck | Amido cm.$^3$ 50 +<br>Destrina » 50 |
| b | gr. 15 | ossido di magnesio | Amido naturale di mais<br>cm.$^3$ 100 |
| c | gr. 15 | » | Amido Zulkowsky<br>cm.$^3$ 100 |
| d | gr. 3 | » | Amido solubile Merck<br>cm.$^3$ 30 |
| e | gr. 3 | » | destrina cm.$^3$ 30 |
| f | gr. 3 | » | glicogene » 30 |
| g | gr. 3 | » | inulina » 30 |
| h | gr. 15 | » | Amido mais » 50 +<br>» Zulk. » 50 |
| i | gr. 3 | » | Amido mais » 15 +<br>Glicogene » 15 |
| l | gr. 3 | » | Amido Zulk. » 15 +<br>Glicogene » 15 |
| m | gr. 15 | » | Amido Zulk. » 50 +<br>Destrina » 50 |

N. B. L'adsorbimento è sempre stato completo; l'osservazione di questa condizione è stata consigliata dal fatto che, specialmente nelle miscele, sono presenti sostanze che vengono fissate con energia diversa quindi l'una potrebbe essere spostata dall'altra e falsare così la conclusione sperimentale.

Dalle prove precedenti si può dedurre:

a) Per quanto riguarda la prova a) nulla si osserva alla lampada Uviol; per eluazione con soluzione idroglicerica si riesce ad ottenere separatamente la reazione dell'amido e della destrina; il liquido che ha servito all'eluazione della parte alta della colonna dà nettamente la reazione amido-iodio; da quello proveniente dalle porzioni inferiori si ha distinta la reazione iodio-destrina; è cioè possibile, mediante l'uso del carbone come adsorbente e di una soluzione idroglicerica come eluante, ottenere la separazione cromatografica di una miscela amido-destrina.

b) Riguardo l'amido naturale di mais, ai raggi ultravioletti si osserva una bella ed intensa fluorescenza azzurra nei primi centime-

tri della colonna, poi più nulla; se ne deduce che l'adsorbimento è avvenuto tutto nella parte superiore della colonna, il che è perfettamente confermato dalla eluazione. La quantità di soluzione filtrata è stata fatta variare e di conseguenza si nota pure una variazione proporzionale nella estensione della zona di adsorbimento. La soluzione si prepara nel modo seguente: si spappola in poca acqua una quantità pesata di amido; si versa in acqua calda in modo da avere una salda all' 1 % (questo solo per avere un termine di riferimento dal lato qualitativo); si fa bollire per qualche minuto e si lascia raffreddare e depositare; indi si filtra su amianto.

Caratteristico è un anello bianco, che si osserva ai raggi ultravioletti, nella zona più alta della colonna adsorbente. All'estrazione però non si nota nulla di particolare; l'ipotesi che esso sia dovuto a destrina (che dà una fluorescenza simile) non sembra ammissibile, sia per l'osservazione precedente, sia perchè venendo questa adsorbita con minore energia, deve fissarsi dopo e non prima.

c) Le soluzioni di amido di Zulkowsky dànno un adsorbimento del tipo di quello dell'amido naturale, però più diffuso e con fluorescenza più debole; anche in questo caso si osserva l'anello bianco come nella prova b). All'estrazione con acqua tutte le porzioni dànno la reazione amido-iodio. L'ultima porzione dà con iodio il colore rosso violaceo di cui si è detto sopra.

d) L'amido solubile Merk si comporta in modo del tutto analogo all'amido solubile di Zulkowsky.

e) All'adsorbimento della destrina si può applicare quanto si è detto per l'amido solubile, però essa viene fissata con minore energia; all'eluazione si ottiene un succedersi di reazioni destrina-iodio di intensità gradualmente minore.

f) Il glicogene viene adsorbito con estrema forza dal carbone e non si riesce ad eluarlo con nessun mezzo. Questa osservazione è già stata fatta da George Bancroft e Edith G. Fry (3) e da Stefan Simonovits (4) il quale adopera come eluante una soluzione di potassa al 60 % da cui precipita il glicogene con cloruro di sodio e alcool, idrolizzandolo in seguito con acidi e dosandolo col Fehling. Con questo metodo non si è potuto eluare il glicogene dall'ossido di magnesio e perciò ho usato il seguente procedimento: si scioglie la colonna di ossido di magnesio in acido cloridrico diluito, freddo, nella quantità necessaria; si aggiunge una forte quantità di alcool; precipita in tal modo, dopo lungo riposo, il glicogene; si filtra e si può determinare il glicogene, sia per idrolisi, sia, se in quantità sufficiente, con la reazione con iodio.

---

(3) Chem. Zentr. 1933, II, 694.
(4) Chem. Zentr. 1934, I, 3373; 1935, II, 855.

All'osservazione alla lampada Uviol, la colonna appare fluorescente in bianco, zonato, fino a metà; poi appare la fluorescenza del supporto; ciò è confermato all'estrazione col metodo detto sopra.

g) L'inulina ai raggi ultravioletti dà una fluorescenza azzurra debolissima appena distinguibile da quella del supporto. Si può eluare con acqua calda e riconoscere con la reazione dello iodio: non si è notato nessun frazionamento.

h) La miscela di amido di mais naturale e amido di Zulkowsky dà intensa fluorescenza azzurra; la miscela può essere frazionata cromatograficamente data la forte differenza di concentrazione con cui viene fissato l'amido naturale rispetto all'amido solubile negli strati superiori. All'estrazione con acqua bollente si ottiene, com' è evidente, la reazione dell'amido col iodio lungo tutta la colonna adsorbente.

i) Nella miscela amido di mais naturale-glicogene, la fluorescenza azzurra dell'amido copre quella brillante bianca del glicogene. Si può ottenere il frazionamento all'estrazione dato che l'amido è eluabile con acqua calda e il glicogene no; questo viene estratto successivamente col metodo detto più sopra. Lo stesso vale per la prova 1) cioè per la miscela amido Zulkowsky-glicogene. Solo la fluorescenza azzurra è meno bella.

j) La miscela amido Zulkowsky-destrina, dà una fluorescenza azzurra che va indebolendo dagli strati superiori verso gli inferiori. All'estrazione nei primi strati si ha netta la reazione dell'amido. Si nota nelle porzioni successive il virare del colore verso quello della reazione amido-destrina, che si può ottenere netto nella ultima porzione; si può quindi dedurre che si ha un parziale frazionamento per via cromatografica della miscela amido Zulkowsky-destrina.

---

R i a s s u n t o. Viene studiato in via preliminare il comportamento di amidi, destrina e glicogene nell'assorbimento cromatografico, dimostrando:

a) che l'ossido di magnesio calcinato leggero è un adsorbente particolarmente adatto per queste sostanze

b) che la luce di Wood può essere utilmente applicata nello studio dei cromatogrammi ottenuti da questi prodotti e dalle loro miscele

c) che è possibile eluare con acqua calda la destrina e l'amido solubile, mentre l'amido naturale si lascia eluare con glicerina

d) che il glicogene non si lascia eluare dal supporto, a differenza degli altri polisaccaridi studiati, e che perciò è particolarmente utile usare come adsorbente una sostanza facilmente solubile in acidi diluiti in modo da ricuperare indirettamente l'adsorbito.

# TIFO EXANTEMATICO EM MINAS GERAIS
## PESQUIZAS DE LABORATORIO

POR

**Octavio de Magalhães**

Do Instituto Biologico Ezequiel Dias, Belo Horizonte

Temos publicado ultimamente uma serie regular de artigos, procurando esclarecer sob vários aspectos o Tifo exantematico do Brasil, em Minas Gerais. Assim vieram a lume: "Diagnostico" (1) — "Anatomia Patologica" (2) — "Reações sorologicas" (3) — "Molestia Experimental" (4) — "O Virus; algumas propriedades" (5) — "Epidemiologia" (6) — "Estudos electro-cardiográficos" (7) — "Aspectos clinicos" (8) e vários outros artigos sobre a transmissão da molestia.

Vamos hoje apresentar o que chamamos o resultado das pesquizas auxiliares de laboratorio, para interpretação melhor, talvez mais exata do aspecto clinico da doença exantematica em Minas Gerais.

Muita cousa já foi dita em "Diagnostico" e "Reações sorologicas". Ocupar-nos-emos hoje apenas de:

1) Hematologia
2) Estudos quimicos no sangue
3) Exame de urina
4) Exame do liquido cefalo-raquiano.

Certo não será possivel publicar aqui todos os relatorios, tecnicas empregadas e pormenores dos diversos e numerosos exames praticados. Eles farão parte das "Memorias do Instituto Biologico Ezequiel Dias", que um dia haveremos de publicar, sobre a molestia. Hoje o nosso trabalho é de conjunto e exprime apenas o resultado das pesquizas.

Fizemos cerca de 70 exames hematologicos, 96 exames de urina, 30 exames do liquido cefalo-raquiano e 27 exames quimicos do sangue em diversas fases da molestia, não raro repetindo varias vêses em alguns doentes, para termos uma ideia das curvas dos diferentes elementos dos liquidos durante o ciclo da doença.

## I

## HEMATOLOGIA

Vamos dar aqui, resumidamente, um apanhado sobre os exames hematologicos que executámos nos doentes com a forma grave do Tifo exantematico em Minas Gerais.

Ao todo fizemos 63 pesquizas. Muita vez repetimos a indagação no mesmo doente, durante a evolução da molestia, duas ou tres vezes. Temos dados hematologicos desde o 4.º até o 62.º dias da evolução morbida.

Alguns curaram-se. A maioria morreu. Em raros não foi possivel a pesquiza completa. Os quadros adiante são de resumo. Os pormenores vão no texto das observações. Orientámo-nos principalmente, em nosso trabalho, pela obra notavel de A. FERRATA (Le Emopatie, vol. I, 1.ª e 2.ª partes e Vol. II — Societa Editoire Libraria — Roma e Milano — Napoli — 1933-1934).

A primeira cousa digna de nota é a leucocitose apurada, não raro precoce e intensa. Naturalmente essa, como as demais reações sanguineas, dependem das condições personalissimas de cada individuo, das molestias anteriores ou intercorrentes. Não ha, porém, duvida alguma de que o virus do Tifo exantematico em Minas Gerais provoca realmente uma forte leucocitose. Esse aumento de glóbulos brancos do sangue cai com a convalescença, mas muito lentamente. E' o contrario do que sóe acontecer no inicio da molestia. Aqui a subida é rapida. Com a diferença de 48 horas, no começo do Tifo exantematico em Minas Gerais, a cifra póde ascender de 7.400 a 59.800 leucocitos por milimetro cubico. Com 62 dias de evolução do mal, quando já não ha febre, a taxa desce de 17.000 por milimetros cubicos anteriores, a 11.500. Em 71,4 % dos casos examinados, houve aumento, não raro notavel, dos leucocitos. Em 14,2 % não houve aumento aparente. Em 3 observações tipicas, apurámos uma leucopenia. Quando a molestia é fulminante, não ha tempo para as reações leucocitarias. E' o mesmo que se apura nos primeiros dias da doença.

Não raro o individuo, que não apresentava leucocitose numa determinada data, reage mais tarde, às vezes 48 horas depois, com um grande aumento dos globulos brancos por milimetro cubico.

Não é facil acompanhar, num doente com Tifo exantematico em Minas Gerais, o ciclo das reações sanguineas. O virus, nas formas graves, as unicas que praticamente nos interessam, mata precoce e quasi invariavelmente os doentes. A edade dos pacientes parece não influir no aumento dos ameboicitos por mmc. de sangue.

Grande numero de autores refere-se à leucopenia no Tifo exantematico classico europeu. E' verdade que nos nossos doentes, com a molestia mineira, só começámos a registrar o exame hematologico do terceiro para o quarto dia em diante, depois de declarado o ciclo morbido. O caso de verdadeira leucopenia registrado foi no 6.º dia de doença, época em que comumente já ha grande leucocitose. Não é só em

quantidade que os leucocitos se modificam, senão tambem em qualidade, como facil é deduzir-se dos quadros que daremos mais tarde.

Assim é que, em 63,3 % dos nossos casos, houve uma neutropenia que chegou a 12 % de neutrofilos na periferia. Sómente em 7 % das observações apurámos uma neutrofilia, as mais das vêses secundaria, permanecendo estacionarios os neutrofilos em 25,3 % das observações registadas.

O interessante, pelo May-Grünwald-Giemsa, é a grande quantidade de neutrofilos, lembrando pelas suas granulações, os leucocitos jovens recemformados. A neutrofilia de alguns casos acentua-se com a marcha do mal.

Digna de nota, contudo, é ainda a ausencia constante e quasi completa, em todas as fases da molestia, dos eosinofilos e basofilos, apezar de grande numero de doentes ser portador de lesões cutaneas, verminoses, destacando-se em nosso meio principalmente a Schistosomose pelo *Schistosoma mansoni*.

Os eosinofilos diminuiram ou desapareceram em 96,6 % dos casos, em todas as fases da molestia. Em 82,5% o desaparecimento foi completo. Nunca vimos uma curva normal de eosinofilos. Em 3,4 % houve eosinofilia. E' possivel encontrar aumento de eosinofilos, bem acentuado, ou curva normal destes leucocitos, na convalescença dos raros doentes que escapam à ação do virus.

Nos que morrem, a eosinofilia não se modifica e continúa igual a zero, até o desfecho final. Os basofilos se apresentam diminuidos ou desaparecidos, em 96,6 % das observações. Em 93,6 % estavam completamente ausentes. Nunca encontramos basofilia. Em 3,4 % a curva dos basofilos estava normal. Estes leucocitos acompanham mais ou menos os eosinofilos no decurso da febre exantematica em Minas Gerais, salvo na convalescença, na qual os eosinofilos aumentam, enquanto os basofilos podem permanecer ausentes.

E' preciso não esquecer que a sifilis, sob todas as suas formas, marca quasi sempre os doentes do interior do Brasil. Em 47,6 % dos doentes havia linfocitose. Considerando, com A. FERRATA, normal a percentagem de 18 a 22 % de linfocitos no sangue periférico, nós tomamos a média geral de 20 % dos adultos e 40 % nas creanças normalmente. (Ob. cit. pg. 66).

Em 14 % das observações havia diminuição dos linfocitos e sem grande alteração da curva desses leucocitos em 36 % dos doentes. Não raro a linfocitose é notavel, atingindo numa observação a 62 % dos leucocitos encontrados no sangue periférico. Ha tambem monocitose, às vezes em cifra elevada. Consideramos, com A. FERRATA, a cifra normal dos monocitos como de 6 a 8 % nos adultos. Em 63,4 % dos doentes

havia monocitose. Houve diminuição desses leucocitos em 14 % do total das observações colhidas. Nas restantes não percebemos qualquer modificação no numero de monocitos por mmc. e por cento no sangue periférico dos doentes.

O Indice de ARNETH apresentava-se desviado para a esquerda em 100 % dos casos. Este desvio permanecia por muito tempo, mesmo no começo da convalescença. Uma observação tivemos, em a qual, nesta época, o desvio voltou-se para a direita.

Quanto ás hemacias, ha de regra uma diminuição do numero global por mmc., durante a doença. A anemia do Tifo exantematico em Minas Gerais póde ser acentuada, mesmo quando o exame de fézes afasta uma verminose ou outra molestia anemiante de permeio. Ela contrasta com o aspecto, de regra robusto, atlético mesmo, de grande numero de doentes. Só uma, em 63 vêses, encontrámos numa contagem a cifra proxima de 10.000.000 de hemacias por mmc. de sangue.

A morte prematura do doente, o periodo de quasi asfixia em que foi feito o exame, a impossibilidade em que nos encontrámos, pela morte do doente, de repetir a prova, a possibilidade de um engano por um defeito de tecnica, obriga-nos a não registar como definitivo o resultado dessa pesquiza unica. Coincidindo com essa destruição de hemacias ha a bilirubinemia, apurada em pesquizas de laboratorio e talvez hematoporfirinemia, suspeitada em muitos doentes.

O indice icterico dos doentes é não raro elevadissimo. Ha baixa da taxa da hemoglobina, que póde chegar a 60 %, e um valor globular elevado, não raro acima da unidade, o que, aliás, está de acordo com as apurações de WOLFF, no Tifo exantematico europeu.

O quadro hematologico do Tifo exantematico em Minas Gerais deixa pensar que esta molestia faz participar intensamente do sindromo clinico o sistema reticulo-endotelial. Seria, pois, segundo PITTALUGA, (GUSTAVO PITTALUGA — Las Enfermedades del Sistema Reticulo Endotelial, 1 vol., 1934, Madrid — Espasa — Calpe) uma reticula endoteliose.

Sendo a mortalidade alta e precoce nas fórmas graves, a evolução completa da fórmula sanguinea não é facil de determinar.

Tivemos a impressão de que a fórma de SCHILLIG se apresentou pelo menos esboçada, na molestia que estudamos. Ha, na maioria esmagadora dos casos, leucocitose. A principio, na invasão, uma fase de luta, com granulocitose e neutrofilia, é apurada. Em seguida, temos a fase de defesa, com monocitose, e por fim a fase de cura, com linfocitose.

Dentro dessa concepção, tivemos variantes individuais das molestias intercorrentes, e provavelmente das variantes do proprio virus, baralhando o quadro hematologico e tornando dificil a interpretação exata dos mesmos.

## I I

## EXAMES QUIMICOS DO SANGUE

Propuzemo-nos a pesquizar nos doentes: Uréa, Creatinina, Cloretos, Glicose, Reserva alcalina e Indice icterico.

Nem sempre foi possivel fazer todas essas provas em todos os doentes. Não depende muito de nós a pratica completa e racional de um trabalho.

### URÉA

Na totalidade (100 %) dos casos graves, apurámos uma *uremia*, às vêses discreta, outras franca, não raro notavel. Em um dos casos (doente I. C. A.) observámos mesmo 205,0 mgrms. % de uréa no sangue! Em caso algum dos doentes em estado grave apurámos doses abaixo de 39 mgrms. %. E' interessante notar que a uréa sanguinea se eleva rapidamente em certos casos graves, dobrando quasi a porcentagem no decorrer da evolução do mal, em poucos dias. O doente B. A. C., que morreu em setembro de 1938, tinha no dia 25 de setembro desse ano 97 mgrms. % de uréa no sangue. No dia 27 do mesmo mês e ano (data de sua morte) o resultado da dosagem foi de 183,6 mgrms. % de uréa no sangue!

Este estado uremico, a nosso vêr, é precoce, acentuando-se com a gravidade da doença. Não conseguimos surpreender a doença nas primeiras horas ou dias de sua evolução. Nossas dosagens foram intentadas do 4.º ao 5.º dia após ter-se declarado a moléstia.

Como mais da metade dos doentes morre dentro de 7 ou 8 dias, não é possivel indagar com muito mais tempo do quadro clinico.

Em quasi metade dos casos, a uréa estava acima de 100 mgrms. %. Quando os doentes tendem para a cura, ha queda imediata da porcentagem de uréa do sangue, e em pouco tudo se normaliza.

Nos casos benignos, não nos foi possivel fazer um juizo seguro, pelo pequeno numero que conseguimos repetir.

Temos a impressão, porém, de que a porcentagem da uréa, nesses casos, não se eleva ou pouco se eleva.

Nada podemos dizer do "Tifo siderans", casos de que só se têm noticias pela necropsia, com a morte subitanea dos pacientes.

## CREATININA

E' sabido do valor que alguns tecnicos querem hoje dar à dosagem da creatinina no sangue, principalmente para o prognostico das nefrites.

Em todos os nossos casos, ela estava aumentada. A média normal, entre nós, apurada pelo Dr. A. P. VIEGAS, é de 1 a 1,5 mgr. %. Nem uma vês encontrámos a porcentagem de creatinina normal. A maxima encontrada foi de 3,1 mgrs. % no doente B. A. C., o qual no dia anterior havia apresentado uma porcentagem de 2,1 mgrs. %. A subida da creatinina foi paralela nele à da uréa sanguinea. Um terço talvês dos casos tinha uma porcentagem de creatinina acima de 2 mgrms. %.

## CLORETOS

Não podemos falar com toda certeza desse elemento no sangue. Nossas pesquizas ainda precisam ser continuadas. Em quasi metade dos casos pesquizados, porém, encontrámos um aumento regular da porcentagem — com 850,0 e 820,0 de cloretos no sangue circulante. Nos outros casos, ele estava dentro da taxa normal.

## GLICOSE

Todas as vêses que pesquizamos a glicemia sanguinea, ela estava dentro dos limites normais.

## RESERVA ALCALINA

A pesquiza da reserva alcalina veiu confirmar a nossa hipotese da intensa acidose dos doentes em estado grave do Tifo exantematico em Minas Gerais. Foi o que apurámos. Só um doente apresentou a porcentagem de $CO_2$ normal. Todos os demais tinham uma reserva alcalina abaixo, muito abaixo do normal. Em dois doentes ela desceu a 14 vols. de $CO_2$% e em nova dosagem a 13 vols. de $CO_2$%. O doente B. D., que apresentou 62,4 vols. de $CO_2$% tinha apenas 38 mgrms. % de uréa, 1,5 mgrms. % de creatinina, 430,6 % de cloretos e 130 mgrms. % de glicose sanguinea, apesar de ter sido um caso fatal.

Este fato não está muito de acordo com a afirmação de que a reserva alta, embora com porcentagem forte de uréa sanguinea, não torna "sombrio" o prognostico. No Tifo exantematico em Minas Gerais, porém, o que mata não são apenas as insuficiencias renal e hepatica, sinão tambem a cardiaca e as lesões do sistema nervoso central.

Esta acidose intensa que os pacientes apresentam é a meu vêr, precoce, e faz parte integrante do quadro clinico do Tifo exantematico do Brasil.

## INDICE ICTERICO

Faltava, apenas, para interpretação da ictericia, pesquizar esse indice biometrico. Ele confirmou nossa hipotese. E' sabido que hiperbilirubinemia encontra-se precocemente e depois intensamente na insuficiencia hepatica toxica ou infecciosa. Ela é encontradiça nas cirroses, na anemia de Biemer, nos tumores hepaticos, etc.

No Tifo exantematico, entre nós, o indice icterico é elevadissimo. A côr do plasma e a do sôro são já carateristicas: fortemente amareladas.

Em todos os casos ele estava acima do normal. Em 2 atingiu a enorme cifra de 100! Em nenhum foi abaixo de 32,2'. Estamos hoje convencidos de que em alguns casos não é apenas a bilirubina que se encontra em grande porção no sangue circulante. A redução da hemoglobina desce mais baixo e talvez seja possivel encontrar no sangue a hematoforfirina, o que explicaria facilmente as necroses extensas da pele, que em alguns doentes já encontrámos.

## III

## URINA

O exame das urinas, feito em série, em varias épocas e num mesmo doente em dias diferentes, pode dar-nos uma idéa exata do estado renal e geral dos doentes da febre exantematica em Minas Gerais.

O aspecto da urina póde ser turvo, com deposito. De regra, é espumosa, amarelada. Às vezes tem uma côr de vinho com deposito francamente hemorragico. Uma cousa desde logo se observa: a quantidade de urina por 24 horas diminúe. Chega, como na febre amarela, às vêses, à anuria. Às vêses essa falta de urina é aparente, desmentida pelas necropsias ou sondagens, que revelam uma paresia vesical — pela natureza neurotropica do virus — e apresenta a bexiga repleta de urina. Mas ha sempre uma oliguria mais ou menos acentuada. A quantidade desce a 800 ou 500 grms. em 24 horas. A densidade varia de 1009 (uma criança — caso benigno — S. A.), até 1020 (tambem caso benigno — J. S.) e 1030 (M. P. — caso grave, mortal). Ela tende, porém, mais para se elevar que para baixar: 1020 — 1016.

Em 96 pesquizas só 3 vêses não encontramos albumina na urina. Esses tres casos foram de cura. Ora encontrámos

traços, ora quantidade apreciavel de albumina. Essa quantidade, porém, jamais atingiu as cifras assinalaveis das nefroses. O maximo que apurámos foi de 5 grms. %.

De regra, a quantidade fica pelos centigramos %. O aparecimento da albumina é precoce. No 3.º dia de doença já é possivel demonstra-la. Só uma vês registrámos traços de glicose na urina, e em tres, traços leves ou fortes de acetona. Em nenhum apurámos acido diacético. A cilindruria é constante e mesmo notavel em alguns doentes. 80 % dos pacientes tinha cilindros na urina. Encontrámos cilindros granulosos, hialinos, epiteliais e hemácicos (raros). Casos houve em que a principio havia albumina e não cilindros. Depois a cilindruria apareceu, com a evolução da doença. Houve casos em que o numero de cilindros atingiu a 5 ou 6 por campo microscópico.

A uréa da urina em grande numero de nossos casos (80 %) estava diminuida. Cerca de 20 % estava normal ou ligeiramente aumentada. Em cerca de 11 % encontrámos uma porcentagem abaixo de 10 mgrms. %. Num caso havia grave alteração total, com 0,80 mgrms. % de uréa apenas na urina. E' preciso não esquecer que a febre exantematica em Minas Gerais provoca alta e permanente pirexia.

A média geral dentre todos os exames foi de 17,255 mgrms. % de uréa encontrada na urina dos pacientes. Enquanto isso acontece, no sangue a porcentagem da uréa se eleva, como já vimos.

## CLORETOS

Outro elemento pesquizado que nos deu resultados muito interessantes foram os cloretos urinarios. O edema, consideravel em alguns doentes, presente na maioria, de tão expressiva aparencia na face exantematica, já nos levára a pensar numa nefrite. A retenção dos cloretos veiu juntar-se ao quadro já conhecido.

Em varias molestias infectuosas, no periodo de estado, ha hipocloruria urinaria: escarlatina, variola, pneumonia, etc. Na pneumonia a retenção é consideravel, durante todo o periodo febril, chegando a 0,50 mgrms. %. Para alguns autores, nesta ultima molestia, a hipocloruria tem até valor prognostico. No Tifo exantematico em Minas Gerais, em 99 % dos casos, a porcentagem dos cloretos na urina estava enormemente abaixada. Em 73,9 % dos casos a porcentagem variou

de 0,00 a 1,50 mgrms. % de cloretos na urina. Em 25 % dos exames não foi possivel encontrar nem traços de cloretos: a porcentagem foi de 0,00 %. A retenção de cloretos era absoluta.

Quero assinalar que a diminuição de cloretos na urina se mantem durante toda duração na molestia, e na convalescença não reaparece rispidamente como na pneumonia, sinão que sóbe lentamente, à medida das melhoras dos doentes. Mesmo na convalescença (doente J. V.) a porcentagem póde ser de 0,00 %. A baixa dos cloretos, sua retenção urinaria, não implica nesses casos na diminuição da uréa na urina. Tivemos doentes, S. R., por exemplo, no qual a uréa era de 23,23 mgrms. % e os cloretos de 1 g. % na urina. O doente M. B. tinha 23,80 mgms. % de uréa e 1,50 mgrms. % de cloretos na urina. Nesse doente não havia cilindros urinarios e a quantidade de albumina era mediocre, em 24 horas. Por outro lado uma porcentagem normal de cloretos urinarios não importava numa identica porcentagem de uréa na urina. A doente Z. A. (caso de gravidade média) tinha 12,5 mgrms. % de cloretos e 11,17 mgrms. % de uréa na urina.

## PIGMENTOS BILIARES

Só talvez em 17 % dos casos os pigmentos biliares se achavam majorados nas urinas dos pacientes.

## HEMACIAS E LEUCOCITOS

Em mais da metade dos casos havia hemacias nas urinas. Ora a quantidade era notavel, ora apenas visivel. Não raro encontrámos "sombras de hemacias" em regular porção. Raramente apurámos uma verdadeira piuria, (4 % dos casos examinados). Aliás, as complicações purulentas são raras na molestia.

Nunca apurámos no sedimento urinário cristais birefringentes, lipóidicos e microbios patogenicos. Quasi sempre eram germes, encontradiços sempre nas urinas de toda a gente. Em alguns poucos exames, encontrámos no sedimento urinário (urina colhida na bexiga) espermatozoides, e fibroblastas. Em outros, já bem mais numerosos, é frequente a quantidade de goticulas de gordura no sedimento urinario.

O alto poder congestionante do virus, como já havia anotado na "anatomia patologica" da doença, explica perfeitamente a grande presença de hemacias ou sombras na urina dos doentes.

# IV

## LIQUIDO CEFALO-RAQUIANO

Nossa opinião, emitida ha tempos (*), e mais do que nunca hoje fortalecida, é que o virus da doença exantematica em Minas Gerais é neurotropico. Ele provoca uma encefalite ou, e não raro, uma meningo-encefalite tipica. Os exames do liquor confirmam esta hipótese. A côr do liquido pode ser de agua de rocha. Uma vez ele veiu xantocrómico. Em muitos saiu francamente ou levemente hemorragico. O liquido cefalo-raquiano recolhido era submetido às seguintes provas: Ross Jones, Pandy, Nonne Appelt, Schumm e Weichbrodt, Takata-Ara; reações coloidais, contagem das celulas (global e especifica); dosagem da albumina, cloretos, glicose, uréa e exame do sedimento. As contagens globais foram feitas na camara de Nageotte e as especificas, pelo May-Grünwald-Giemsa. Em 70 % dos casos havia aumento de globulina e em 67 %, de albumina total no liquor. Tivemos a alta porcentagem de 1,40 % de albumina no doente M. O. A. A porcentagem de albumina às vêses quasi dobra em poucas horas num mesmo doente, com a evolução da doença. No doente E. V. P., de 0,40 mgrms. % passou, em 24 horas, a 0,71 mgrms. % e a globulina, de reação negativa, passou a fortemente positiva. Na primeira punção o liquido era limpido; na segunda, apresentou-se xantocromico. Na primeira contagem, as hemacias eram 8,1 por milimetro cubico e os leucocitos eram 2,3. Na segunda contagem apurámos 48 hemacias e 15 leucocitos por $mil.^3$. O numero de leucocitos, aliás, no liquor, apresenta-se não raro elevadissimo. Em cerca de 23 % dos casos ele se mostrou majorado. Casos houve de 164,8 leucocitos por milimetro cubico (Caso A. E.). E' importante assinalar que a contagem especifica mostra a predominancia, nesses casos, de monolobados: linfocitos e monocitos. Em 30 exames, 22 se apresentaram com maior ou menor quantidade de hemacias no liquido. Às vêses a porção encontrada era notavel. E' preciso assinalar que procurámos afastar todas as causas de erro possiveis e que os globulos vinham menos do liquor, pela congestão meningea e mesmo pequenas hemorragias, comuns na doença. A reação de Takata-Ara, quando positiva, póde apresentar 2 tipos: luetico e meningitico. Não raro, com a subida das proteinas totais, a reação, de negativa, transforma-se em fortemente positiva para o tipo meningitico.

---

(*) Tifo exantematico de Minas Gerais. Brasil-Medico N. 21 pg. 585. 22 de Maio de 1937.

DOENTE E. V. O.

1.ª dosagem (Aspecto transparente) — 20-2-939

| Mastic Coloidal | Takata-Ara | Albuminas totais | Globulina | Hemacias |
|---|---|---|---|---|
| Negativa | Negativa | 0,40 mgrms. % | 0 | 8,1 por mmc. |

| Leucocitos | Glicose | Cloretos | Uréa |
|---|---|---|---|
| 4,3 por mmc. | 75 mgrms. % | 575, mgrms. % | 35 mgrms. % |

2.ª dosagem (Aspecto xantocromico) 21-2-939

| Mastic Coloidal | Takata-Ara | Globulina | Albuminas totais | Hemacias |
|---|---|---|---|---|
| 001110 | Fortemente meningitico | + ++ + | 0,71 mgrms. % | 48 por mmc. |

| Leucocitos | Glicose | Cloretos | Uréa |
|---|---|---|---|
| 15 por mmc. | 58 mgrms. % | 633,1 mgrms. % | 150 mgrms. % |

88 % dos leucocitos eram linfocitos.

Temos a impressão de que o ataque meningitico não é precoce. Só já mais adiante, na evolução do sindromo, é que o virus ataca as meninges. Os sintomas clinicos, aliás, em alguns casos de creanças ou adultos, é tipicamente de um meningismo ou de franca meningite.

De outra feita, vemos reações, como no doente D. R. (1939):

Liquido cefalo-raquiano — Dosagens

| Mastic Coloidal | Glicose | Cloretos | Albuminas | Globulina |
|---|---|---|---|---|
| 022100 | 90 mgrms. % | 951,5 mgrms. % | 0,10 mgrms. % | + |

| Hemacias | Leucocitos | Takata-Ara |
|---|---|---|
| 0 | 0,6 por mmc. | Tipo luetico |

Ambos esses doentes morreram com a doença tipica dentro dos primeiros 8 dias. Este ultimo foi o unico caso em que encontrámos elevada a taxa de cloretos. Nos demais percebemos uma tendencia à diminuição. As pressões dos liquidos não chamam a atenção pela altitude.

Que concluir desses resultados? Ha, não raro, um aumento das albuminas e globulinas com hipercitose por monolobados, e reações colhidas tipo meningitico, o que deixa a molestia no grupo das provocadas por "virus neurotropico". Certo é preciso não exagerar esses valores biometricos, que, como todos em Biologia, são relativos.

E' preciso não esquecer que doentes ha, nos quais o liquor apresenta as reações normais.

Conclusões gerais:

No tifo exantematico do Brasil em Minas Gerais encontrámos:

1.º) Leucocitose, a principio neutrofilica, com monolobose e por fim, linfocitose.

2.º) Anemia ligeira, com valor globular alto.

3.º) Acidose notavel, com uremia franca persistente e ictericia assinalavel, mostrando a insuficiencia hepatica precoce.

4.º) Constancia notavel de **nefrite aguda** e retenção grande e persistente de cloretos e asotemia.

5.º) Frequente meningo-encefalite tipica.


TYPHUS EXANTHÉMATIQUE EN MINAS GERAES
RECHERCHES AU LABORATOIRE

*Resumé*

*Nos dernières observations nous ont fait constater que le Typhus exanthématique du Brésil en Minas Geraes produit:*

*1 — Leucocytose, neutrophilique au commencement, monolobose et après, lymphocytose.*

*2 — Legère anemie, avec une haute valeur globulaire.*

*3 — Remarquable acidose, urémie persistante et très forte jaunisse, qui démontre la précoce insuffisance hépatique.*

*4 — Souvent, nephrite aigüe, azotemie et forte et persistante retention de chlorets.*

*5 — Fréquente méningo-encéphalite typique.*


BIBLIOGRAFIA


1 — Magalhães, Octavio de — 1939 — Tifo exantemático em Minas Gerais. Diagnostico. *Acta Medica*, 3, 4-13.

2 — Magalhães, Octavio de — 1939 — Tifo exantemático em Minas Gerais. Anatomia Patológica. *Brasil-Medico*, 53, 104-113.

3 — Magalhães, Octavio de — 1939 — Tifo exantemático em Minas Gerais. Reações sorológicas. *Brasil-Medico*, 53, 325-329.

4 — Magalhães, Octavio de — 1939 — Tifo exantemático em Minas Gerais. 1.ª parte — Molestia experimental. *Brasil-Medico*, 53, 351-362.

5 — Magalhães, Octavio de — 1939 — Tifo exantemático em Minas Gerais. O Virus; algumas propriedades. *Acta Medica*, 3, 203-216.

6 — Magalhães, Octavio de & J. Afonso Moreira — 1939 — Tifo exantemático em Minas Gerais. Epidemiologia. *Brasil-Medico*, 53, 882-891.

7 — Magalhães, Octavio de & Renato Pena — 1939 — Tifo exantemático em Minas Gerais. Estudos electro-cardiográficos. *Brasil-Medico*, 53, 950.

8 — Magalhães, Octavio de & J. Afonso Moreira — 1940 — Tifo exantemático em Minas Gerais. Aspectos Clinicos. *Brasil-Medico*, 54, 195-202, 252-260, 272-278.

Vol. 11 — Art. 27 1940

# DIE HISTOLOGISCHEN LEBERVERÄNDERUNGEN BEI EXPERIMENTELLEM RIFT-VALLEY-FIEBER UND IHRE BEZIEHUNGEN ZUR GELBFIEBERPATHOLOGIE

VON

F. Marschall, Tropeninstitut, Hamburg

Als Rift-Valley-Fieber oder "enzootische Hepatitis" wurde 1931 von DAUBNEY, HUDSON und GARNHAM eine epidemisch bei Schafen im Gebiet des Rift-Tales in der Kenya-Kolonie (Ost-Afrika) auftretende Krankheit beschrieben, die vorher noch nicht beobachtet oder zum mindesten noch nicht genauer untersucht worden war. Der Erreger dieser Seuche ist ein filtrierbares Virus von kleiner Grössenordnung (23 bis 35 mμ nach BROOM und FINDLAY). Unter natürlichen Bedingungen wird die Krankheit wahrscheinlich durch eine Stechmücke, *Taeniorhynchus brevipalpis,* übertragen, Laboratoriumsuntersuchungen beweisen jedoch, dass auch direkte Übertragung möglich ist. Das Rift-Valley-Fieber befällt vorwiegend Schafe und verursacht besonders bei jungen Lämmern eine hohe Sterblichkeit, während bei erwachsenen trächtigen Schafen häufig frühzeitiger Abort eintritt. Im Vordergrund des pathologischen Geschehens stehen toxische Organschädigungen, deren pathologisch-anatomisches Substrat vor allem in hochgradigen Leberveränderungen besteht, die bereits von DAUBNEY, HUDSON und GARNHAM in ihrer ersten Veröffentlichung ausführlich beschrieben wurden, und auf die im einzelnen unten weiter eingegangen werden soll. Unter natürlichen Umständen ist das Virus auch für Kühe und Ziegen pathogen, ferner auch für den Menschen. Beim Menschen verläuft die Erkrankung in Form eines kurzen Dengue-ähnlichen Fiebers, bei dem Gliederschmerzen im Vordergrund der Erscheinungen stehen. Im Laufe der Zeit haben accidentelle menschliche Laboratoriumsinfektionen (KITCHEN, SCHWENTKER und RIVERS) genauere Beobachtungen ermöglicht. Ausser den genannten Tieren sind ferner Affen, Mäuse, Ratten, Eichhörnchen, Wühlmäuse, Frettchen und Hamster experimentell infizierbar.

Im Hamburger Tropeninstitut ist auf der Abteilung von Professor NAUCK ein Rift-Valley-Fieber-Stamm, der uns von FINDLAY freundlichst überlassen wurde, eine Zeitlang auf Mäusen und insbesondere auf Hamstern gehalten und studiert worden. Auch hier erwies sich das Virus als ausserordentlich virulent. Es entwickelt sich beim Hamster ausnahmslos eine tödliche Infektion, auf die im einzelnen hier

nicht weiter eingegangen werden soll. Pathologisch-anatomisch stehen auch beim Hamster die Leberveränderungen im Vordergrund. Die im folgenden mitgeteilten Befunde stützen sich auf Material von Hamstern und auch von Mäusen, das im Laufe der Untersuchungen gewonnen wurde.

Die histologischen Leberveränderungen bei Schafen werden von DAUBNEY, HUDSON und GARNHAM als so charakteristisch beschrieben, dass man auf ihrer Grundlage "imstande ist, die Diagnose ohne die Möglichkeit eines Irrtums überhaupt zu stellen". Sie bestehen, kurz zusammengefasst, in einer herdförmigen Degeneration von Leberzellen, der eine Infiltration des zerfallenen Gewebes mit phagozytären Zellen, vorwiegend polymorphkernigen Leukozyten und Histiozyten, folgt. Im allgemeinen erstrecken sich diese Nekrosen auf die intermediären Zonen der Leberläppchen, sodass einige Zellen in der Peripherie des Lobulus sowie in der unmittelbaren Nachbarschaft der Zentralvene erhalten bleiben (DAUBNEY, HUDSON und GARNHAM). Bei jungen Lämmern sind die degenerativen Veränderungen oft so hochgradig, dass das Lebergewebe als solches überhaupt nicht mehr zu erkennen ist. Bei erwachsenen Schafen, bei denen der Verlauf nicht so foudroyant ist, sind die Leberläsionen meist nicht so extrem, sodass man, je nach der Heftigkeit der Krankheit, bezw. nach dem Zeitpunkt des Eintritts des Todes, die Entstehung der Veränderungen im einzelnen chronologisch verfolgen kann. Die zytologischen Veränderungen des Lebergewebes wurden von FINDLAY an kleinen Laboratoriumstieren, vor allem an Mäusen, nochmals besonders genau untersucht. Diese Befunde können von uns an unserem Hamstermaterial im allgemeinen bestätigt werden.

Die frühen Stadien der Leberveränderungen sind beim Hamster wie auch bei anderen empfänglichen Tieren (FINDLAY) offensichtlich herdförmig. Und zwar bestehen sie in einer einfachen Nekrose einer mehr oder minder scharf abgrenzbaren Zellgruppe, die darin zum Ausdruck kommt, dass sich an diesen Stellen die Leberstruktur verwischt, die Kerne der Leberzellen zerfallen und Plasma hyalin degeneriert. Die Konturen der ehemaligen Zellen sind in diesem Stadium im allgemeinen noch zu erkennen, auch liegen noch zahlreiche, intensiv färbbare Kerntrümmer verstreut in dem nekrotischen Gebiet. Meist sind auch schon polymorphkernige Leukozyten anwesend. Diese herdförmigen Nekrosen sind an sich jedoch noch nicht so charakteristisch und können zuweilen auch bei anderen Erkrankungen des Hamsters als unspezifische Veränderungen beobachtet werden. So kann man z. B. derartige herdförmige Nekrosen nicht selten bei mit Kala Azar infizierten Hamstern neben den typischen, durch Kala-Azar bedingten

Veränderungen finden. Die Lage dieser herdförmigen Nekrosen beim mit Rift-Valley-Fieber infizierten Hamster lässt, wie auch FINDLAY angibt, eine gewisse Vorliebe für die intermediäre Zone des Leberläppchens erkennen, wenngleich auch zentral oder peripher gelegene Herde vorkommen. Jedoch kommt es innerhalb sehr kurzer Zeit zu einer Ausdehnung der Nekrosen fast über das ganze Lebergewebe, sodass bei besonders akut verlaufenden Fällen nur noch wenige normale Leberzellen im Schnitt angetroffen werden, ohne dass man noch einen Anhaltspunkt dafür fände, von wo die Nekrose ihren Ausgang genommen hat. Vielmehr wird der Eindruck erweckt, als ob das gesamte Parenchym zur gleichen Zeit denselben Veränderungen anheim gefallen ist. Diese Degeneration der Leberzellen weist besondere Züge auf, die sie deutlich von anderen infektiösen Leberschädigungen unterscheidet. Man findet in den degenerierenden Zellen runde, kleinere oder grössere, hyaline Körper, die sich mit Eosin intensiv rot färben und keinerlei Struktur erkennen lassen. Sind diese Körper klein, so können sie in der Mehrzahl in einer Zelle vorhanden sein, meistens findet sich jedoch ein einzelner, grösserer, derartiger Körper in einer Zelle, deren Kern dann deutliche Degenerationszeichen — Pyknose, Karyorhexis — zeigt, oder bereits völlig unfärbbar geworden ist. Zuweilen zeigen diese hyalinen Körper eine deutliche Trennung vom übrigen Zellplasma, indem sie von einer schmalen, ungefärbten Zone umgeben sind. Oder aber das gesamte Zellplasma wandelt sich in einen solchen hyalinen Körper um, der dann völlig den Zusammenhang mit den umgebenden Zellen verliert. Schliesslich können auch mehrere derartig hyalinisierte Zellen nebeneinander liegen oder sich gegenseitig teilweise umgreifen, sodass ihre Herkunft vom Leberparenchym absolut nicht mehr zu erkennen ist. Diese Gebilde gleichen den in der englischen Literatur als "Councilman bodies" bezeichneten Körpern und den von DA ROCHA LIMA in seiner klassischen Schilderung besonders hervorgehobenen hyalinisierten, nekrotischen Leberzellen beim Gelbfieber völlig. Ausser mit Eosin lassen sich diese hyalinisierten Zellen auch mit der Mallory Färbung und der Mann' schen Färbung gut zur Darstellung bringen. Neben dieser besonders auffallenden hyalinen Degeneration, bei der es selbstverständlich nicht in jeder Zelle zur Bildung dieser Körper kommt, findet man auch fettige Degeneration, jedoch tritt diese beim Rift-Valley-Fieber gegenüber den anderen Veränderungen in den Hintergrund. Fetttropfen finden sich besonders in denjenigen Zellen, die im übrigen in bezug auf Kern und restliches Protoplasma wenig oder unverändert erscheinen.

Typische Veränderungen konnten wir ferner in Übereinstimmung mit DAUBNEY, HUDSON und GARNHAM und mit FINDLAY am Kern der

Leberzellen feststellen in Form von oxyphilen intranukleären Einschlüssen. Bei der Beobachtung dieser acidophilen Kerneinschlüsse konnten wir die von FINDLAY erhobenen und sehr genau beschriebenen Befunde nur bestätigen und es erübrigt sich deswegen, an dieser Stelle eine eingehendere Schilderung ihrer Struktur und ihrer Entwicklung wiederzugeben. Intranukleäre Einschlüsse sind bei Viruskrankheiten nichts Seltenes (Herpes, Virus III u. a.). Die beim Rift-Valley-Fieber auftretenden unterscheiden sich jedoch von anderen dadurch, dass sie nur in den Parenchymzellen, also in diesem Falle nur in den Leberzellen, nicht etwa auch in den Gallengangsepithelzellen oder in den Kupfferschen Sternzellen auftreten. In dieser Tatsache findet sich ein weiterer gemeinsamer Zug mit dem Gelbfieber, denn dasselbe gilt für die von MAGARINOS TORRES 1929 zuerst beschriebenen acidophilen Kerneinschlüsse in den Leberzellen bei Gelbfieberfällen. FINDLAY hat oxyphile Kerneinschlüsse bei Rift-Valley-Fieber bei Schafen, Ziegen, Rhesusaffen, Mäusen, Ratten, Wühlmäusen, Grauhörnchen und Hamstern gefunden, wir konnten sie bei Hamstern und bei weissen Maus bestätigen. Beim Gelbfieber sind sie bisher nur bei Menschen und Affen gefunden worden. FINDLAY gibt an, dass beim Rift-Valley-Fieber die Verteilung der Kerneinschlüsse besonders die Zellen in der Peripherie eines nekrotischen Herdes bevorzuge. Eine derartige Anordnung konnten wir im allgemeinen nicht bemerken. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass, wie erwähnt, bei den meisten Fällen die Leberveränderungen so hochgradig sind, dass einerseits zwischen nekrotischen Herden und unverändertem Gewebe kaum eine Grenze zu ziehen ist, und andererseits bei den vorgeschrittenen Fällen häufig der grösste Teil der Zellen schon derartig geschädigt ist, dass feinere zytologische Studien garnicht mehr möglich sind. Man findet deshalb auch nicht in allen Fällen die typischen hyalinen "Councilman bodies" in grösserer Zahl gleich ins Auge fallend, oder in typischer Anordnung, sondern oft sind diese Bilder durch den allgemeinen Untergang des Lebergewebes verdeckt und man muss sich die typischen Befunde erst aus dem etwas verwirrenden Bild heraussuchen.

Ein bei unserem Mäuse- und Hamstermaterial häufig wiederkehrender Befund ist die ausserordentliche Blutfülle der Leber. Die Kapillaren zwischen den einzelnen Leberzellbalken sind maximal erweitert und strotzend mit Erythrozyten gefüllt und können direkt den Eindruck von Blutungen erwecken. Sicher kommt es bei dem Zelluntergang auch zu Blutungen, diese erwecken aber mehr die Vorstellung, als ob die Blutkörperchen einfach vorhandene leere Räume ausfüllen und es sich also um einen Blutaustritt auf Grund der Nekrose und nicht um eine Gewebsnekrose im Gefolge einer Blutung handelt.

Diese Leberveränderungen beim Rift-Valley-Fieber weisen also in ihrer Gesamtheit eine starke Aehnlichkeit mit denen bei Gelbfieber auf. Insbesondere sind die hyalinisierten, nekrotischen Zellen von COUNCILMAN, später von KLOTZ und BELT — um nur einige Autoren herauszugreifen — als für Gelbfieber besonders typisch angesehen worden. DA ROCHA LIMA hat in seinen grundlegenden Arbeiten über die pathologische Anatomie des Gelbfiebers diese Veränderungen zwar auch beschrieben, jedoch nicht so stark in den Vordergrund gestellt, dass sie als pathognomonisch gelten sollten, sondern vielmehr Wert auf die Anordnung der nekrotischen Zellen in Form von versprengten Nekrosen, die wieder vorwiegend in der intermediären Zone des Leberläppchens liegen, gelegt. Dass diese "Councilman-Körper" nicht nur für Gelbfieber allein typisch sind, geht daraus hervor, dass sie eben auch beim Rift-Valley-Fieber das Bild beherrschen können. Das Gleiche gilt für die intranukleären Einschlüsse. Nun sind die Erreger des Gelbfiebers und des Rift-Valley-Fiebers zweifellos miteinander verwandt, denn sie stehen sich nicht nur in ihrer Grössenordnung nahe, sondern zeigen auch in biologischer Beziehung manche Aehnlichkeit. So haben MACKENZIE, FINDLAY und STERN in ähnlicher Weise, wie das beim Gelbfiebervirus möglich ist, neurotrope Modifikationen des Rift-Valley-Fieber-Virus züchten können, die sich in ihren immunisierenden Eigenschaften ähnlich wie neurotrope Gelbfieberstämme — natürlich entsprechend — verhalten. Auch die grosse Aehnlichkeit der pathologisch-anatomischen Veränderungen sprechen für eine Verwandtschaft der Erreger. So wird denn auch das Rift-Valley-Fieber heute im allgemeinen, wenn man schon klassifizieren will, der Gelbfieber-Dengue-Gruppe zugerechnet.

Es ist nun aber bemerkenswert, dass kürzlich BELT (1939) Leberveränderungen bei mehreren Fällen von Verbrennungen mitgeteilt hat, die denen bei Gelbfieber und Rift-Valley-Fieber sehr ähnlich sind, und zwar sowohl in Bezug auf Vorhandensein von "Councilman lesions" als auch von intranukleären Einschlüssen. Das deutet mit einer gewissen Sicherheit darauf hin, dass die intranukleären Einschlüsse zu dem Virus in keiner direkten Beziehung stehen, wie dies von manchen Seiten angenommen wird, sondern allenfalls ein Reaktionsprodukt auf die Noxe darstellen. Es lässt sich weiterhin daraus die Folgerung ziehen, dass die beschriebenen charakteristischen Leberveränderungen bei Rift-Valley-Fieber und Gelbfieber auch durch andersartige toxische Schädigungen, die nicht durch ein Virus bedingt sind, entstehen können.

Durch die Tatsache, dass andere Ursachen gelbfieberähnliche histologische Bilder hervorrufen können, ist nun keineswegs die Sicherheit der postmortalen Gelbfieberdiagnose auf Grund des Leberbefundes irgendwie in Frage gestellt, denn Verwechslungen kommen in der Praxis überhaupt nicht in Frage, da Rift-Valley-Fieber ja nur gelegentlich auf den Menschen übergeht und dann leicht verläuft, sodass es zu keiner Leberschädigung kommt und dies ausserdem — abgesehen von Laboratoriumsinfektionen — nur in einer Gegend vorkommt, die gelbfieberfrei ist. Es bleibt deshalb die Viscerotomie, die besonders in Süd-Amerika der Gelbfieberforschung so grosse Dienste geleistet hat und deren Zuverlässigkeit zum grössten Teil auf der eindeutigen Umreissung der Gelbfieber-Histopathologie durch DA ROCHA LIMA beruht, immer noch das sicherste diagnostische Mittel der epidemiologischen Gelbfieberforschung.

———o———

# ZUR TECHNIK DER ART- UND RASSENUNTERSCHEIDUNG MITTELS VARIABELER, IN IHRER VARIATIONSBREITE SICH ÜBERSCHNEIDENDER MERKMALE.

## DIE MITTELWERTBILDUNG AUS MEHREREN VARIABLEN MERKMALEN

VON

**E. Martini,** Tropeninstitut, Hamburg

Der Versuch von HEINCKE, ein Verfahren zu finden, wie man nahe verwandte Arten oder gar Rassen unterscheiden kann, wenn sich die gewöhnlich zur Unterscheidung herangezogenen Merkmale in ihrer Variationsbreite überschneiden, ist durch die Arbeit von DIEMER in den Gesichtskreis der Entomologie gerückt. Bei DIEMER wird das Verfahren auf Stechmücken und ihre verschiedenen Entwicklungsstufen angewandt. Seinem Wesen nach ist es, soweit überhaupt, überall anwendbar, wo nahe verwandte Lebensformen unterschieden werden sollen. HEINCKEs Überlegungen hängen eng mit seiner Auffassung der "Spezies" bzw. der systematischen Einheiten überhaupt zusammen. Die Vorstellung HEINCKEs gemahnt, wie DIEMER richtig bemerkt, an die PLATON'S. Er denkt sich gewissermassen die Idee einer Art oder Rasse nicht variabel, sondern gekennzeichnet durch die Mittelwerte aller variabeln Merkmale. Von dieser Idee ist jedes wirkliche Exemplar und jedes Merkmal desselben eine nicht ganz fehlerfreie Verwirklichung, ein Abfall. Es hat z. B. die Zahl der Wirbel eines Herings einer geg. Rasse nicht den typischen Mittelwert, sondern sie liegt "zufällig" etwas höher oder niedriger, usw. Diese Abweichungen kann man sich durch "Zufälligkeiten" der Entwicklungsgeschichte und der Einflüsse der Umwelt bewirkt denken. Wie aber das Tier auf diese reagiert, in welchem Masse sie die einzelnen Eigenschaften vom Mittel abbiegen können, das ist wieder ein M e r k m a l, das in der Idee selbst gegeben ist und das seinen Mittelwert hat, um den die Abweichungen der einzelnen Merkmale fallen. Daraus folgt dann die Konzeption, dass, wenn einige Merkmale weit vom Idealbild abweichen, eine viel grössere Zahl sich eng an diese halten muss, weil sonst der typische Durchschnitt der Abweichungen nicht zustande käme. Wir würden sagen, die Arten sind gekennzeichnet durch die Mittelwerte ihrer Merkmale und die durchschnittliche Grösse der Abweichungen von ihren Mittelwerten, bzw. moderner, die Standardabweichung derselben.

Aus HEINCKEs Erörterungen ergeben sich zwei Verfahren recht verschiedener Art, von denen hier nur das eine erörtert werden soll. Ihm entspricht mit gewisser Annäherung das von DE BUCK und Mitarbeitern angewandte. Um diese Grundüberlegung HEINCKEs zu erläutern, mache ich unnatürliches Beispiel auf. (*)

Man nehme einmal an, jede Culiciden-Larve habe 300 Haare, die aber alle im wesentlichen gleichartig seien. Jedes Haar sei dicht über der Basis in mehrere Äste geteilt, durchschnittlich bei der einen Art in 7, bei der anderen in 5. Im ersteren Falle mögen die Variationsbreiten von 5-11, im zweiten Falle von 4-7 reichen. Alle Haare verhalten sich gleich. Die Haarstellung sei (wie in Wirklichkeit) stereotyp, sodass man in jedem Segment jedem Haar eine Bezeichnung geben kann, z. B. vorderes Seitenhaar, innerstes Rückenhaar usw.

Wollte man nun am innersten rechten Rückenhaar des zweiten Abdominalsegmentes eine Larve bestimmen und fände hier die Zahl "6" der Äste, so wäre es unmöglich zu sagen, zu welcher Art das Tier gehört. Hat man aber eine Gruppe von 300 Larven vor sich und weiss aus irgendeinem Grunde, dass sie alle zur gleichen Spezies gehören, z. B. weil sie alle aus den Eiern desselben Weibchens stammen, dann ergeben alle diese innersten rechten Rückenhaare der zweiten Abdominalsegmente mit ihren Astzahlen eine Verteilungskurve, deren Mittelwert den Artwert bereits mit grosser Genauigkeit repräsentiert, z. B. 7,013 ± 0,061. Ein Zweifel, zu welcher Art diese Population gehört, könnte danach nicht bestehen.

Wenn nun, würde ungefähr HEINCKE überlegen, alle 300 Haare einer Larve unabhängig voneinander variieren, so müssen von den 300 Haaren einer einzigen Larve die Strahlenzahlen sich genau so gut zu einer Fehlerkurve ordnen lassen, die genau so aussehen muss, wie es die oben angeführte Kurve für das eine Haar bei den 300 Individuen tut. Auch hier würde man einen Mittelwert finden, vielleicht 6,993 ± 0,070, der genau ebenso eindeutig und sicher dieses eine Stück als zugehörig zu der Art mit Mittelwert 7 kennzeichnen würde, wie dort die Population. In der Theorie geht das glänzend auf. Denn für solche mathematischen Überlegungen vereinfachen wir uns gedanklich ja erst die Tatbestände. In Wirklichkeit sind sie aber nicht so.

---

(*) HEINCKE selbst sagt: "Dagegen findet man bei Durchmusterung aller der zahlreichen Horizontalreihen in meinen Tabellen, von denen jede die Kombination der Eigenschaften eines Individuums enthält, sehr bald folgende Tatsache heraus. In jedem Individuum kommen in den verschiedenen Eigenschaften Abweichungen der allerverschiedensten Grösse vor, immer jedoch derart, dass die meisten Eigenschaften kleinere Abweichungen von ihren Mitteln zeigen, die wenigsten grosse. Mit anderen Worten: Die verschiedenen Eigenschaften eines Individuums zeigen eine ähnliche Gruppierung in der Grösse ihrer Abweichungen vom Mittel wie die verschiedenen Individuen der Rasse in einer einzelnen Eigenschaft. Oder noch kürzer: Alle Eigenschaften eines Individuums verhalten sich ähnlich, wie alle Individuen in einer Eigenschaft.

Da die Abweichungen aller Individuen einer Rasse von ihrem Mittel dem Gesetze des Zufalls folgen, so liegt also die Vermutung nahe, dass auch die Abweichungen der verschiedenen Eigenschaften eines Individuums von ihren Mitteln durch den Zufall kombiniert sind. Das ist aber dasselbe, was oben gasagt wurde: sie sind voneinander unabhängige Ereignisse.

Da variieren z. B. die verschiedenen Haare um ganz verschiedene Mittelwerte der Astzahl, bei Form *A* vielleicht das innerste Rückenhaar nicht um 5, sondern um 3,3 und bei *B* nicht um 7, sondern um 4,9, und dafür das vorderste Seitenhaar bei *A* auch nicht um 5, sondern um 6,2 und um 8,6 bei *B*. Das heisst, jedes einzelne Haar hat seinen besonderen Mittelwert. Da kann man nun zwei Wege gehen. Entweder man bildet einfach die Gesamtsumme von 4 oder 8 oder 20 oder allen Haarstrahlen (in der Theorie). Bei allen Haarstrahlen würde ja für die Mitglieder der einen Art 1500, für die der anderen 2400 der Durchschnittswert sein. Als Variationsbreiten, weil sich ja gegenläufige Fehler in der Summe grossenteils kompensieren, würden wir vielleicht für die eine 1260-1730 und für die andere 2133-2790 erhalten. Diese Zahlen würden sich nicht mehr überschneiden und jedes einzelne Tier wäre klar erkenntlich.

Andererseits kann man auch die Zahlen der Haare, die eine zu hohe oder zu niedrige mittlere Strahlenzahl haben, angleichen, z. B. die für das innere Dorsalhaar gefundene immer mit 6/4,1,* die für das vordere Seitenhaar gefundenen mit 6/7,4 multiplizieren, damit allen einzelnen Strahlenzählungen das gleiche Gewicht geben und von diesen korrigierten Werten den Durchschnitt bilden. Beide Verfahren gehen solange, als die Variabilität bei allen Haaren gleichsinnig verschieden ist. Würde aber einmal der Fall eintreten, dass z. B. das innerste Ventralhaar bei der Form *A* um den Wert 4, bei der Form *B* um den Wert 2 schwankt, also bei der Form *A* die einen Haare astreicher, die anderen astärmer sind als bei *B*, einige auch vielleicht gleich, dann fallen die Summen und die Mittelwerte nicht mehr weit genug auseinander, um klare Trennungen zu erlauben. Man könnte sich dann noch damit helfen, dass man vom Mittelwert beider Arten als Sollwert die Abweichungen zählt und kompensiert, dass also die Werte 5 und 7 ds — 1 und + 1 erscheinen. Bei 3,3 und 4,9 aber zählt man von 4,1 Ersteres als — 0,8, Letzteres als + 0,8 und erweitert die gefundenen Werte eben mit 6/4,1.

Dann aber ist bei den Merkmalen, wo die Überlegenheit von *B* über *A* sich umkehrt, das Vorzeichen der Varianten auch umzukehren. Theoretisch ist also eine solche Verarbeitung der Beobachtungswerte und Erreichung einer Unterscheidung möglich, sofern nicht soviele Arten und Rassen mit sich so stark überschneidenden Variationsbreiten und so nahen Mittelwerten der Merkmale in Frage kommen, das selbst die Gesamtzahlen der Haarstrahlen Verteilungskurven ergeben, die sich grossenteils decken.

(*) $= \frac{5 + 7}{2} : \frac{3,3 + 4,9}{2}$

Praktisch aber kommt die Summierung der Haarstrahlen aller Haare selten in Betracht, weil auch Mückenlarven Haare lassen müssen, und in Wirklichkeit nicht viele Larven noch alle Haare haben. Es wird schon bei der Beanspruchung einer grösseren Anzahl gut sichtbarer, also stärkerer Haare der Fall sein, dass der einen Larve das eine, der anderen das andere Haar fehlt, der einen eines, was in Wirklichkeit immer nur einfach, selten zweiteilig ist und der anderen eines, das durchschnittlich 6teilig ist. Diese Ausfälle wirken sich also ganz verschieden aus, sodass die Strahlensummenbildung aus den wirklich vorhandenen Haaren nichtssagend wird, und die Einordnung wirklicher Larven nach dieser Methode oft unmöglich sein wird. Diese böse Wirklichkeit zwingt dazu, sich, wie das DE BUCK und DIEMER getan haben, auf eine mässige Zahl "Bestimmungshaare" zu beschränken. Dann wird die Zahl der wegen Beschädigung aus der Statistik fallenden Stücke nicht zu gross. Nach dem Verfahren der korrigierten Strahlenzahlen sind nun solche Ausfälle tragbar. Dabei ergibt sich aber sehr viel Beobachtungs-und Rechenarbeit, sodass nur bei Aufgaben sehr erheblichen Wertes diese Methode berechtigt zu sein scheint. Kann man sich nicht auf wenige Merkmale, z. B. in dem bisher gewählten Beispiel auf Untersuchung weniger Haare beschränken, wie das DE BUCK und Mitarbeiter tun?

Hier kommt sofort der theoretische Einwand. Will man bei stark sich überschneidenden Variationskurven den Mittelwert erkennen, so muss er mit möglichst geringem mittleren Fehler ermittelt werden. Das geht nur bei grossen Zahlen. 10 Merkmale etwa genügen schwerlich, wenn von jedem die Verteilungskurven der Werte sich stark überlagern. Man bedarf sehr viel grösserer Zahlen von Merkmalen, wie sie weder DE BUCK noch DIEMER genommen haben.

Dann aber müssen die Merkmale unabhängig voneinander variieren. Das heisst, ob der Form *B* ein Haar 6, 7, 8, 9 usw. Strahlen hat, darf nichts damit zu tun haben, ob ein benachbartes Haar über oder unter Durchschnitt Strahlen hat.

Diese Frage ist bezüglich der Larvenhaare der Stechmücken von H. KRUEGER vor Jahren bereits an *Aedes punctor (meigenanus)* in einer grundlegenden Untersuchung behandelt worden. Es ist bedauerlich, dass diese vielleicht wichtigste Arbeit auf dem ganzen Gebiet der Variabilität der Stechmückenlarvencharaktere sowohl der Amsterdamer Schule als der Leidener entgangen ist. KRUEGER weist eine starke positive Korrelation der Strahlenzahlen besonders zwischen symmetrischen aber auch zwischen benachbarten Haaren nach und macht sie sogar zwischen allen Haaren der *Aedes punctor*-Larven wahrschein-

lich. Damit fällt nach der ausdrücklichen Ausführung HEINCKES hier die Anwendbarkeit seiner Methoden weg, was die genannten Autoren nicht bemerkt zu haben scheinen. Erst muss man in die Überlegungen das einstellen, was KRUEGER über die Abhängigkeit von Merkmalen untereinander vermittelt hat, ehe man solche Wege wie DIEMER und DE BUCK gehen kann.

Das bemerkt DIEMER sachlich auch bei der erwachsenen Mücke zwischen Flügelbreite und -länge. Neben der Letzteren bringt ihn die Verwertung der Ersteren nicht weiter. Nur vermeidet er die nächstliegende Formulierung, "weil zwischen beiden eine starke positive Korrelation besteht, und das Verfahren nur auf nicht oder sehr wenig korrelierten Merkmalen aufgebaut werden kann".

Die Sache kommt ferner zum Ausdruck darin, dass der Maxillarindex neben der Flügellänge keine erheblichen Vorteile bietet. Es spricht sich darin die von mir längst nachgewiesene positive Korrelation beider aus. Wäre sie gradlinig, so liesse sich die von der Flügellänge unabhängige Abänderung der Zahnzahl herausschaelen durch Eliminierung der Abhängigkeit, indem man z. B. die zur Flügellänge relative Zahnzahl errechnet. Das ist VAN THIEL'S Zahnindex, der eben aus diesem Grunde sich DIEMER auch verwendbar erwies. Das Versagen der Haarstrahlkombinationen, weil sie korreliert sind, spricht sich ferner darin aus, dass mit der Heranziehung immer weiterer Haarpaare der Gewinn an bestimmbaren Exemplaren nach DIEMER immer geringer wird, sodass man schätzungsweise sagen kann: Selbst bei Berücksichtigung aller Larvenhaare bei *A. mac. atroparvus* gegen *messeae* würden schwerlich mehr als 50 % der Exemplare unterscheidbar werden. In Wirklichkeit! Im Gegensatz zu der für unabhängig variierende Merkmale eben entwickelten Theorie, nach der absolut sichere Bestimmbarkeit in allen Fällen erwartet werden müsste.

Die wichtigen Ergebnisse KRUEGER's waren: dass es innerhalb einer Population Larven gibt, die im Ganzen eine stärkere Teilungstendenz der Haare zeigen als andere. Das mag auf angeborener Grundlage beruhen. Dafür spricht, dass solche Unterschiede auch bei verschiedenen Arten, also sicher auf genotypischer Grundlage vorkommen (das, was über die Rassen und ihre verschiedenen Strahlenzahlen neuerdings ermittelt ist, spricht in derselben Richtung). Durch die Tatsache aber, dass eine Laboratoriumszucht, die zu kleineren Tieren geführt hatte, als die Freilandtiere waren, kleinere durch-

schnittliche Strahlenzahlen zeigte, bewies KRUEGER auch eine Modifizierbarkeit der Haarteilungsneigung ganzer Tiere (*).

Wenn man durch völlig gleiche Bedingungen für alle Tiere einer zu untersuchenden Gruppe die Umweltwirkung auf die Haarteilungstendenz der ganzen Individuen ausschalten könnte, würde die Korrelation in solchen Gruppen natürlich stark verringert werden. Das spricht sich denn auch in KRUEGER's Ergebnissen aus, obwohl er nicht besonders darauf hinweist, nämlich darin, dass die Korrelation im Gesamtmaterial der drei Individuengruppen viel grösser ist als in jeder der einzelnen Gruppen in sich. Bei der genotypischen Grundlage der Variation werden wir aber weit eher als bei der Modifikation daran denken, dass einige Familien zu stärkerer, andere zu schwächerer Ausbildung bestimmter Haargruppen neigen könnten. Neben einem korrelationsfördernden Moment wird also wahrscheinlich ein korrelationsstörendes in der erblichen Variabilität gegeben sein. Was man aus den Tabellen KRUEGER's für die tatsächliche Richtigkeit solcher theoretischer Überlegungen entnehmen könnte, beruht doch wohl noch auf zu kleinem Material, um bedeutungsvoll zu sein.

Und endlich ergibt die in allen Fällen stark unvollständige Korrelation, dass zu dem durch Anlage und Vorgeschichte bestimmten Charakter des Einzeltieres noch Zufallsvarianten der Einzelhaare kommen, wie sie sich besonders in den häufigen Asymmetrien der Strahlenzahlen ausdrücken.

Was man nun durch die DE BUCK'sche Methode allein einengen kann, sind die Zufälligkeiten, die bei demselben Tier die Einzelhaare betreffen. Um sie abzuschwächen, hat ja schon KRUEGER mit den Strahlenzahlen ganzer Haargruppen gearbeitet. Ob aber die Larven einer infolge der Vorgeschichte haarteilungsgeneigten Modifikation der an sich strahlenärmeren Rasse oder einer teilungsabgeneigteren der strahlenreicheren zugehören, der Lösung dieser Frage kann man so nicht näher kommen.

Zwei ideale Merkmale für die HEINCKE'sche Methode wären bei den *Aedes*-Larven einerseits Haarzahlen, bei denen man in der Tat die Zufallsvarianten teilweise eliminieren kann, indem man das Testhaar wenigstens beider Körperseiten beachtet, oder eine Gruppe Testhaare wählt, zweitens die Striegelzahnzahl. Denn zwischen diesen beiden Merkmalen hat KRUEGER Fehlen jeglicher Korrelation ermittelt.

(*) Zu denselben Ergebnissen sind ja später, ohne es klar zu formulieren, auch DE BUCK und Mitarbeiter und DIEMER gekommen. Besonders bedeutsam ist hier, dass die Kulturen der ersteren unter sich verschieden sind und von DIEMER'S Kulturen und den Naturfängen wieder verschiedene Durchschnittswerte ergeben haben. So beweisen diese Zuchten die starke Beeinflussung der allgemeinen Haarverzweigungstendenz eines Individuums bzw. einer Population durch die Umwelt. Denn schon die sehr verschiedenen, manchmal auffallend kleinen Flügellängen erwachsener Freilandanophelen lehren, dass die Bedingungen der Natur nicht immer so gleichartig sich auswirken, wie es unter den Naturfängen DE BUCK's und DIEMER's der Fall war und höchst wahrscheinlich durchaus einmal den Verhältnissen gewisser Kulturen ähnlich sein können.

Die Tendenz einiger neurerer ist es herauszustellen, wieviele wichtige Unterschiede der *A. maculipennis*-Rassen es ausser der Zeichnung der Eier, d. h. den Merkmalen des Exochorions auf der Rückseite der Eier, noch gibt und wie herrlich weit man mit ihnen kommen kann. Es ist natürlich sehr interessant, sich auch bei Merkmalen, deren Variabilität sich bei zwei verwandten Arten überschneidet, über die Mittelwerte und damit über die Fuelle der wirklich vorhandenen Unterschiede Rechenschaft zu geben. In der Bestimmung der Einzeltiere ist man damit aber kaum weiter gekommen. Hier mag nur darauf hingewiesen sein, was in einer nächsten Abhandlung weiter ausgeführt werden soll, dass die Tendenz, s t e t s jedes Individuum als Einzelwesen zu behandeln, unbiologisch ist. Man muss sich erst Rechenschaft geben, ob das i m g e g e b e n e n F a l l e berechtigt ist. Bei den Eiern ist es in der Regel nicht. Einzeln tritt das "Anopheles-Ei" in der Natur überhaupt kaum auf. Bei den meisten Untersuchungen, bei denen eine "Rassen"-bestimmung von Eiern notwendig wird, liegen sie als Gelege vor. Bei diesen ist meiner Erfahrung nach es fast niemal nötig, genaue Mittelwertmessungen usw., zu machen, um zu einem Entscheid zu kommen. Mögen auch e i n z e l n e E i e r etwas zweideutigen Aussehens vorhanden sein, so erlaubt doch die Oberflächenansicht mit mässiger Vergrösserung aus der Zeichnung der Eier und dem Bau der Columellen mit für praktische Zwecke ausreichender Ausnahmslosigkeit die G e l e g e zu bestimmen, und zwar meist auf den ersten Blick.

Erst auf den Ergebnissen dieser Technik bauen sich unsere Erfahrungen über reine Populationen auf und auf der Verfügung über solche Erfahrungen über die Variationsbreite von Merkmalen, gewisse Kenntnisse über ihre Korrelation und Modifizierbarkeit. Die Kenntnisse der Haarstrahlenzahlen, die für Rassen, nicht etwa blos für Populationen kennzeichnend sind, kurzum, jene ganze Fülle von Detailkenntnissen, die man nun so stark unterstreicht, dass es fast scheinen möchte, als ob sie schliesslich doch einen Ersatz für die grundlegenden Beobachtungen von FALLERONI geben könnten, die überhaupt erst das Fundament für ihre Ermittelung geschaffen haben.

Es wird in einer späteren Untersuchung gezeigt, dass mit solchen statistischen, sich in der Variationsbreite s t a r k überschneidenden Merkmalen auch nach der zweiten Methode von HEINCKE Ergebnisse zu erwarten theoretisch nicht berechtigt ist. Aus der Beurteilung der Voraussetzungen, welche HEINCKE Ergebnisse ermöglichten, Voraus-

setzungen, die er aber in seinen theoretischen Erörterungen nicht ausreichend unterstreicht, wird sich ergeben, dass die Beobachtung von FALLERONI die *conditio sine qua non* der ganzen modernen Entwicklung der Anophelesrassen-Lehre ist.

## LITERATUR

DE BUCK, A. G. VAN DER TORREN & N. H. SWELLENGREBEL — 1933 — Report for the year 1932 on investigation into the racial composition of Anopheles maculipennis in Holland. *Riv. di Malariol.* 12.

DIEMER, I. H. — 1936 — Over Biotypen van Anopheles maculipennis.

HEINCKE, F. — 1898 — Naturgeschichte des Herings. Teil I. Abhandlg. d. Deutschen Seefischerei-Ver. 2.

KRÜGER, H. — 1927 — Einige variationsstatistische Erhebungen über die Beborstung der Larve von Aedes meigenanus. Zool. Anz. 63.

———o———

# ÜBER MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN AN BLUTPARASITEN DURCH EINWIRKUNG CHEMOTHERAPEUTISCHER SUBSTANZEN.

## DIE WIRKUNG VON SYNTHALIN (DEKAMETHYLEN-DIAGUANID) AUF TRYPANOSOMEN UND LEISHMANIEN

VON

Prof. Dr. med., Dr. med. vet. h. c. Martin Mayer

Instituto Nacional de Higiene, Caracas, Venezuela

Ich möchte nicht im Kreise derer fehlen, die meinem langjährigen Kollegen und treuen Freunde zu seinem 60. Geburtstage eine wissenschaftliche Gabe widmen. Leider erlaubt mir die beschränkte Arbeitsmöglichkeit, die sich mir bis vor kurzem bot, nur einen unvollkommenen Beitrag zu liefern.

Ich habe schon lange die Ansicht vertreten, dass die chemotherapeutische Wirkung der Heilmittel auf protozoische Blutparasiten zunächst eine direkte ist und erst sekundär die zum Schlagwort gewordene "Mobilisation der Abwehrkräfte" bei der Vernichtung in Funktion tritt. Solche Einwirkungen müssten sich ja auch bei geeigneten Parasiten rein morphologisch nachweisen lassen. In der Tat sind die am längsten bekannten Formen solcher Wirkung die "Chininformen" bei der Malaria. Dabei war natürlich zunächst nicht zu entscheiden, ob es sich um direkte oder indirekte Wirkung handelt. Eine Entscheidung darüber konnte nur gefällt werden, wenn sich zeigte, dass bestimmte wirksame Stoffe auf bestimmte Teile der Zellen einen Einfluss ausübten. Einen direkten Anhalt für eine solche Wirkung ergaben meines Wissens erstmalig die Befunde von WERBITZKI (1909) in Ehrlichs Institut, später von den Schülern PAUL EHRLICHS, GONDER, KUDICKE, LEUPOLD, fortgesetzt und erweitert. Es zeigte sich, dass bestimmte Farbstoffe der Pyronin-Acridin-und Oxazin-Reihe, ferner Fuchsin und Tryparosan bei Einverleibung wirksamer Dosen bei Mäusen den Blepharoplast der verschiedensten Trypanosomen dauernd zum Verschwinden brachten, sodass sogar neue blepharoplastlose Trypanosomenrassen entstanden. Einen neuen Beitrag zur solcher elektiven Wirkung auf bestimmte Zellbestandteile konnte ich selbst liefern. Ich beschrieb mit meinen Mitarbeitern SEI, SHINTAKE, ZEISS, dass Bayer "205" ein kompliziertes Harnstoffderivat, zunächst die Teilungsfähig-

keit der Trypanosomen hemmt. Es kommt wohl zur Teilung der Kerne und Blepharoplasten, auch teilweise der Geisseln, aber die Fähigkeit der Protoplasmateilung geht verloren, sodass Zwillingsformen und Mehrfachteilungen mit breiter Protoplasmabrücke entstehen, ferner merkwürdige Verlängerungen des Hinterendes und Störungen in der Entwicklung des Geisselapparates; auch blepharoplast- oder kernlose Formen kommen vor. In der Arbeit von SEI geben eine Reihe von farbigen Bildern die charakteristischsten Formen wieder. In den Endstadien des Unterganges sieht man Bepharoplastvacuolen, gewöhnliche Mehrfachteilungen, geblähte und abgerundete Formen, Auftreten von Protoplasmagranulationen, die nichts Charakteristisches darstellen, sondern auch in überlebendem Blut *in vitro*, sowie, bei sterbenden Tieren und Kadavern gefunden werden. Solche Degenerationen, wie die letztgnannten, sind vielfach fälschlich auch als typisch für einzelne Mittel angegeben worden, sie wiederholen sich fast bei allen wirksamen Mitteln und sind m. E. eine unspezifische Erscheinung vor dem Zugrundegehen der Trypanosomen. Dies muss hier festgestellt werden, da wiederholt Autoren, die mit hohen Dosen arbeiteten, letztere Formen als typisch ansprachen. U. A. bringen sie auch N. und H. v. JANCSO, denen wir so wertvolle Beiträge zur mikrobiologischen Grundlage chemotherapeutischer Wirkungen verdanken, — neben den von mir und meinen Mitarbeitern beschriebenen Formen der gestörten Teilung, der verlängerten Hinterenden, die sie bestätigten — als charakteristisch. Es sei nochmals allen, die bei chemotherapeutischen Versuchen morphologische Beobachtungen machen wollen, dringend gesagt, dass die primäre Wirkung nur im peripheren Blut sichtbar gemacht werden kann, wenn die Parasiten nicht zu rasch verschwinden, sodass die Wirkung successive verfolgt werden kann. Wir betonten dies stets, gaben z. B. Mäusen Dosen von 0,00005 — 0,000025 g Bayer 205 und verfolgten die Wirkung in 2 stündlicher Untersuchung. Mit hoher Dosierung von Bayer 205 fanden sie RODENWALDT und mein Schüler STEFFAN nicht. (Obwohl Letzterer dies in seiner unten besprochenen Arbeit als Ursache ausdrücklich betont, wird er als "Nichtbestätiger" unserer Befunde angeführt) (N. u. H. v. JANCSO. SCHLOSSBERGER).

Auf Grund unserer Beobachtungen fasste ich seiner Zeit den Gedanken, dass weitere solche Untersuchungen als Grundlage für eine Kombinationstherapie gelten könnten, wenn sich zeigte, dass verschiedene Trypanosomenheilmittel auf verschiedene Zellteile der Trypanosomen einwirken würden. Ich beauftragte STEFFAN mit diesen Untersuchungen, der in einer sorgfältigen Versuchsreihe feststellte, dass verschiedene Farbstoffe eine primäre protoplasmaschädigende Wirkung ausüben, dagegen die Antimonpräparate eine einwandfrei nach-

weisbare Affinität zum Kern zeigten. (Ich glaube denn auch in einigen Versuchen an Leishmaniahamstern Letzteres beobachtet zu haben, doch habe ich es nicht systematisch verfolgt).

Bei der Malaria wurden weitere wichtige Feststellungen erhoben, als SIOLI und besonders JAMES zeigten, dass die "Atebrinformen" ganz andere Veränderungen zeigen als die "Chininformen". Nach JAMES kommt es zu Anhäufung von Pigmentklumpen im Protoplasma und dann zu vollkommener Pigmentausscheidung, am Cytoplasma selbst treten Verdünnungen, Einrisse und Vakuolen auf. Bei Affenmalaria bestätigten und erweiterten diese Befunde NAUCK und MALAMOS, indem sie nach meiner Methode der direkten Einwirkung des Mittels auf eingebrachte Parasiten im Tierkörper (NAUCK, Untersuchungen über die Wirkung von "Bayer 205" — Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. 29, 1925, S. 1) gesunden Affen zunächst Atebrin und gleich darauf grosse Mengen Plasmodien der Affenmalaria in die Blutbahn spritzten.

Einen weiteren kleinen experimentellen Beitrag zu diesen Fragen glaube ich durch einige Versuche, die ich mit Synthalin seit Herbst 1937 bis Herbst 1938 ausgeführt habe, liefern zu können. (*)

Im Jahre 1935 hatten N. und H. v. JANCSO mitgeteilt, dass sie mit Synthalin bei gewissen Trypanosomenstämmen eine starke trypanocide Wirkung erreichen, ja selbst fortgeschrittene Infektionen heilen konnten. Sie kamen zu diesen Versuchen auf Grund ihrer Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel (auf den hier nicht näher eingegangen werden soll). Als charakteristische morphologische Einwirkung beschreiben sie nun Formen, die ganz ähnlich denen von ihnen beschriebenen Germaninformen waren: zunächst 2kernige Teilungsformen in abnorm hoher Zahl, dann Mikro- und Makrotrypanosomen, mehrkernige Riesenformen mit Geisselmissbildungen, bizarre Degenerations-und Untergangsformen. 1936 beschrieben SCHERN und ARTAGAVEYTIA-ALLENDE gleichfalls chemotherapeutische Erfolge mit Synthalin und Anticoman (einem weniger toxischen Synthalin-Präparat), sie fanden es auch gegen Rekurrens-Spirochäten wirksam.

Diese Ergebnisse mit Guanidin-derivaten waren merkwürdigerweise lange Zeit von den Chemotherapeuten nicht beobachtet worden. Bald nachdem ich meine Versuche begonnen hatte, erschienen aber die ersten Arbeiten von WARRINGTON YORKE, der die Ergebnisse von JANCSO und SCHERN nicht nur bestätigte, sondern bald mit seinen Mitarbeitern über ganz ausserordentliche Wirkungen weiterer von ihnen synthetisierter Guanidinpräparate berichten konnte, die sich nicht

---

(*) Der Direktion des jüdischen Krankenhauses in Hamburg, die mir einen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hatte, möchte ich hier dafür danken.

nur auf Trypanosomen beschränkten, sondern auch andere Blut-und Gewebsprotozoen günstig beeinflussten.

In meinen eigenen Versuchen mit "reinstem Synthalin", das mir die Firma Schering-Kahlbaum freundlicherweise zur Verfügung stellte, konnte ich die Befunde der genannten Autoren an Mäusen mit Infektion von *Trypanosoma brucei* und *equiperdum* im wesentlichen bestätigen. Ich verwendete meist die gleichen Dosen, wie sie N. und H. v. JANCSO gaben, nämlich 50-100 $\gamma$ pro Dosis (0,2-0,4 ccm einer Lösung von 0,01 g Synthalin auf 40 ccm physiol. Kochsalzlösung). Nicht in allen Fällen kam es zu völliger Ausheilung, sondern es traten Rezidive ein, die auch bei weiterer Synthalingabe nicht zu heilen waren.

Bei der systematischen Beobachtung der behandelten Tiere fiel mir nun bald auf, dass unter der Einwirkung des Mittels zahlreiche Trypanosomen blepharoplastlos wurden. Da bekanntlich auch normalerweise manchmal vereinzelte Trypanosomen keine Blepharoplasten zeigen, habe ich natürlich bei beiden Trypanosomenstämmen die nicht behandelten Kontrollmäuse genau verfolgt. Neben den blepharoplastlosen Formen fand ich zahlreiche, bei denen der Blepharoplast an die äusserste Spitze des Hinterendes gerückt war, sodass ich annehme, dass der Blepharoplast nicht aufgelöst, sondern an den Hinterenden ausgestossen wird. Ob das Auftreten von blepharoplastlosen Formen, bei denen das Hinterende stumpf "wie glatt abgeschnitten" erschien, auch als Synthalinwirkung aufgefasst werden kann, möchte ich nicht als sicher annehmen, da auch Trypanosomen mit Blepharoplast bei unbehandelten Mäusen manchmal diese Veränderung zeigen.

Der Versuch durch Synthalinpassagen blepharoplastlose Stämme — wie bei den obengenannten Farbstoffen — zu gewinnen, misslang, es überwogen nach Abimpfung bald wieder die blepharoplasthaltigen Formen.

Ich konnte also bei Synthalinbehandlung als Anfangswirkung keine gleichen Veränderungen wie bei "Bayer 205"-Behandlung beobachten, sondern eine primäre Einwirkung auf die Blepharoplasten. Auf die oben erwähnten "Untergangsformen", die sich später auch finden lassen, will ich nicht eingehen.

Natürlich interessierte mich auch die Wirkung auf verwandte Erreger. Ich konnte aber nur einige Tastversuche bei Kala-Azarhamstern vornehmen. Dabei stellte ich zunächst fest, dass 1 ccm einer 1 % igen Synthalinlösung (= 10 mg Synth.) einen normalen Hamster innerhalb von 4 Tagen tötete, 20 mg innerhalb 24 Stunden.

Kala-Azarhamster I, der am 22.April 38 infiziert war (Dr. KIKUTH), zeigte am 14. 7. 38 bei Leberpunktion spärliche Leishmanien und zahlreiche *Trypanosoma criceti.*, erhält am 15. 7. = 5 mg Synth.: Leberpunktion am 16. 7.

ergibt keine Wirkung; sowohl Leishmanien wie Trypanosomen sind zahlreich und zeigen beide guterhaltene Blepharoplasten (Tier stirbt an Punktionsfolge), Kultur von Leishmanien gelingt.

Kala-Azarhamster II, 14. 7, Leberpunktion: Leishmanien zahlreich, *Trypanosoma criceti* spärlich, 25. 7. = 8 mg Synthalin: Leberpunktion am 27. 7.: *Trypanosoma criceti* + mit gut erhaltenen Blepharoplasten, Leishmanien ziemlich zahlreich, die meisten ohne Blepharoplast und mit gequollenem Kern, aber noch einzelne gut erhalten. In der angelegten Kultur auf NNN Agar am 2. 8. und später vereinzelte sichere Crithidiaformen, die zweifellos zu *Trypanosoma criceti* gehören, aber keine Leptomonaden. Der Hamster erhält am 3. 8. 38 = 5 mg Synthalin, am 6. 8. 38 = 5 mg Synth. Leberpunktion am 9. 8. 38 ergibt in Haufen liegende Leishmanien, zum Teil mit, zum Teil ohne Blepharoplasten keine Trypanosomen. Kultur verunreinigt. 18. 8 = 7 mg Synth., 2. 9. = 6 mg. Synth. Leberpunktion am 7. 9. ergibt wieder Leishmanien. Das sehr abgemagerte Tier stirbt am 8. 9. 38.

Ich wage nicht endgültige Schlüsse aus diesen lückenhaften Versuchen zu ziehen, glaube aber doch, dass die Wirkung auf die Hamstertrypanosomen unverkennbar war, bei denen ich aber keine morphologischen Veränderungen feststellen konnte. Auch ob das Fehlen des Blepharoplasten bei zahlreichen Leishmanien tatsächlich auf der Wirkung des Synthalins beruhte, kann aus dem einem Versuch nicht geschlossen werden. Eine genügende therapeutische Wirkung übte Synthalin nicht auf die Kala-Azar des Hamsters aus.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird auf den Wert der Beobachtung morphologischer Veränderungen bei Protozoen durch die Einwirkung chemotherapeutischer Substanzen hingewiesen. Bei einigen Versuchen mit Synthalin bei Mäusen mit Infektion von *Trypanosoma brucei* und *equiperdum* ergab sich eine Einwirkung auf den Blepharoplast. Auch in einem Versuch an einem Kala-Azarhamster ergab die Leberpunktion nach der Behandlung zahlreiche blepharoplastlose Leishmaniaformen und gequollene Kerne. Heilung gelang nicht. Die gleichzeitig vorhandenen Hamstertrypanosomen verschwanden unter der Behandlung.

## LITERATUR

Gonder, F. W. — Zbl. f. Bact. O I 53, 1909, S. 303.
James, S. P. — Transact. Roy. Soc. trop. Med. 28, 1934/35, S. 3 & 462.
Von Jancso, N. & H. — Ztschr. f. Immunforschg. 86, 1935, S. 1.
Leupold — Ztschr. f. Hyg., 104, 1925, S. 641.
Mayer, M. & Zeiss, H. — Arch. Schiffs-u. Trophyg., 24, 1920, S. 257.
Nauck, E. G. — Arch. Schiffs-u. Trophyg., 29, 1925, S. 1.
Nauck, E. G. & Malamos, B. — Klin. Wochschr., 15, 1936, S. 888.
Rodenwaldt, E. & Douwes, I. B. — Arch. Schiffs-u. Trophyg. 17. 1923, S. 305.

SCHERN, K. & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R. — Ztschr. f. Immunforschg. 89, 1936. S. 21.
SEI, S. — Ztschr. f. Hyg. & Inf., 100, 1923, S. 416.
SHINTAKE, T. — Arch. f. Schiffs-u. Trophyg. 27, 1923, S. 433.
SIOLI, F. — D. M. Wochschr. 1932, I. S. 531.
STEFFAN, P. — Ztschr. f. Hyg. & Inf., 96, 1922. S. 263.
WERBITZKI, F. W. — Ztbl. f. Bact. 0. I. 53, 1909, S. 303.
YORKE, W. L., LOURIE, E. M. & KING, H. — Lancet 233, 1937, S. 1360.

———o———

# ARANHAS DO PARANÁ

POR

C. de Mello-Leitão

Rio de Janeiro

Com 3 figuras no texto

O Paraná é, dos Estados meridionais do Brasil, o de fauna menos conhecida, especialmente se o compararmos com Santa Catarina e Rio Grande do Sul, de onde H. VON IHERING e HETSCHKO enviaram a KEYSERLING grande número de espécies. Dos senhores F. LANGE DE MORRETES, Fr. ZENO ROHR, e dos Frades Franciscanos de Rio Negro recebi milhares de exemplares de aranhas desse Estado, das quais dou abaixo o catálogo. As espécies marcadas com um asterisco não tinham ainda sido observadas nesse Estado e as marcadas com dois asteriscos são novas para o Brasil. As novas espécies vão descritas no final.

## *Actinopodidae*

1 — *Actinopus crassipes* (KEYSERLING), 1891. Rio Grande do Sul (KEYS.) Paraguai (SIMON), S. Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná. Muito comum.

2 — *Actinopus paranensis* MELLO-LEITÃO, 1922. Pinheiros — Paraná.

## *Ctenizidae*

*3 — *Stenoterommata maculatum* (BERTKAU), 1880. Terezópolis ou S. João Del-Rei (BERTKAU). Comum no Rio de Janeiro (região montanhosa). Rio Negro — Paraná.

## *Dipluridae*

4 — *Achetopus parallelus* MELLO-LEITÃO, 1922.

5 — *Thalerothele fasciata* BERTKAU, 1880. Comum desde a Venezuela até ao Rio Grande do Sul.

*6 — *Thelerothele uniformis* MELLO-LEITÃO, 1922. S. Paulo. Colhido em Cachoeirinha por LANGE DE MORRETES.

## *Avicularidae*

7 — *Grammostola actaeon* (POCOCK), 1903. O mais comum dos grandes Aviculariidas do Brasil meridional.

8 — *Grammostola fasciata* MELLO-LEITÃO, 1922. Entre Rios — Paraná.

9 — *Grammostola ferruginea* MELLO-LEITÃO, 1922. Cachoeirinha — Paraná.

*10 — *Grammostola longimana* MELLO-LEITÃO, 1922. Comum de S. Paulo para o Sul. Seu veneno foi estudado por VITAL BRASIL e VELLARD (1926) e a sua biologia pelo PE. RAMBO (1933).

*11 — *Grammostola pulchra* MELLO-LEITÃO, 1922. Ocorre desde S. Paulo até ao Rio Grande do Sul. O seu veneno foi estudado por VELLARD (Le venin des araignées, 1936).

*12 — *Grammostola pulchripes* (SIMON), 1891. Paraguai (SIMON), Mato Grosso (VELLARD) Rio Grande do Sul e Paraná.

13 — *Homoeoma villosum* (KEYSERLING), 1891. Comum no Rio de Janeiro até ao Rio Grande do Sul. Catamarca — Argentina (Birabén).

## *Scytodidae*

14 — *Loxosceles loeta* (NICOLET), 1849. Comum em toda a América do Sul.

15 — *Scytodes fusca* WALCKENAER, 1837. Toda a região Neotrópica. São sinónimos desta espécie *S. campinensis* e *S. discolor* MELLO-LEITÃO.

*16 — *Scytodes maculata* HOLMBERG, 1876. Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina.

*17 — *Scytodes vittata* KEYSERLING, 1877. Rio de Janeiro, Minas Gerais, S. Paulo, Paraná.

## *Pholcidae*

*18 — *Metagonia bifida* SIMON, 1893. Rio de Janeiro (SIMON). Os Franciscanos colheram-na em Rio Negro.

*19 — *Spermophora maculata* KEYSERLING, 1891. Santa Catarina (KEYSERLING), S. Paulo (MOENCKHAUS) Rio de Janeiro e Paraná (M-L.).

## *Mimetidae*

*20 — *Arocha rochai* sp. n. Rio Negro.

21 — *Ero catharinae* KEYSERLING, 1886. Rio de Janeiro, S. Paulo, Paraná e Santa Catarina.

*22 — *Ero lata* KEYSERLING, 1891. Rio de Janeiro, S. Paulo, Rio Negro — Paraná.

23 — *Gelanor altithorax* KEYSERLING, 1893. Desde o Rio de Janeiro até ao Rio Grande do Sul.

24 — *Gelanor zonatus* (C. KOCH), 1845. Comum em toda a América Meridional.

## *Uloboridae*

*25 — *Miagrammopes luederwaldti* MELLO-LEITÃO, 1925. Blumenau (LUEDERWALDT) e Rio Negro (ZENO ROHR).

26 — *Uloborus geniculatus* (OLIVIER) 1791. Cosmopolita tropical.

## *Dinopidae*

*27 — *Dinopis biaculeata* SIMON, 1896. Rio de Janeiro, Minas Gerais e Mato Grosso (SIMON). No Museu Nacional ha exemplares da ilha do Bananal — Goiás, dos arredores de Petrópolis e de Cachoeirinha — Paraná.

## *Amaurobiidae*

28 — *Amaurobius iheringi* KEYSERLING, 1891. Do Rio Grande do Sul ao Paraná.

*29 — *Amaurobius tristissimus* HOLMBERG, 1876. Desde a Provincia de Buenos Aires até ao Paraná.

**30 — *Calleva paupercula* SIMON, 1892. Descrita da Argentina. FR. ZENO ROHR encontrou-a em Rio Negro.

## *Pisauridae*

*31 — *Trechalea keyserlingi* F. CAMBRIDGE, 1903. Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.
*32 — *Trechalea limai* sp. n. Ribeira de Iguape.
*33 — *Trechalea syntrechaloides* sp. n. Cachoeirinha.

## *Lycosidae*

34 — *Diapontia uruguaiensis* KEYSERLING, 1876. Perú, Argentina, Uruguai, do Rio Grande do Sul até S. Paulo.
35 — *Lycosa nychthemera* (BERTKAU), 1880. Comum desde o Rio de Janeiro até ao Rio Grande do Sul.
*36 — *Lycosa ornata* PERTY, 1833. Descrita sem indicação de localidade. FR. ZENO ROHR colheu-a em Rio Negro.
37 — *Lycosa paranensis* MELLO-LEITÃO, 1937. Cachoeirinha.
*38 — *Lycosa pardalina* (BERTKAU), 1880. Rio de Janeiro (BERTKAU). No Museu Nacional ha numerosos exemplares de Paraíba do Norte, Pernambuco, S. Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Montevideo, Provincia de Buenos Aires, Mendoza, Catamarca e Córdoba.
39 — *Lycosa pardaloides* MELLO-LEITÃO, 1937. Rio Negro.
*40 — *Lycosa poliostoma* (C. KOCH), 1848. Brasil (do Paraná para o Sul), Paraguai, Uruguai, Argentina e Chile.
*41 — *Lycosa pictipes* (KEYSERLING), 1891. Rio Grande do Sul (KEYSERLING). Colhida em Antonina por LANGE DE MORRETES.
*42 — *Lycosa pugil* (BERTKAU), 1880. Teresópolis (BERTKAU). Curitiba (LANGE DE MORRETES).
43 — *Lycosa raptoria* WALCKENAER, 1837. Muito comum desde Pernambuco até à Provincia de Buenos Aires.
44 — *Pirata velox* KEYSERLING, 1891. De S. Paulo até o Uruguai.
45 — *Porrima diversa* (CAMBRIDGE), 1877. Comum em toda a América Meridional.
*46 — *Porrima freiburgensis* (KEYSERLING), 1876. Rio de Janeiro (KEYSERLING). LANGE colheu-a no Paraná e o PE. BUCK no Rio Grande do Sul.

## *Oxyopidae*

*47 — *Hamataliva porcata* (SIMON), 1898. Pará, Mato Grosso, Pernambuco, Espirito Santo e Paraná.
*48 — *Oxyopes altifrons* sp. n. Rio Negro.
49 — *Oxyopes constrictus* KEYSERLING, 1891. Do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul.
*50 — *Oxyopes macroscelides* MELLO-LEITÃO, 1929. Goiás, Mato Grosso, Paraguai, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná.
51 — *Oxyopes salticus* HENTZ, 1845. Comum em toda a América.
52 — *Peucetia rubrigastra* MELLO-LEITÃO, 1929. De Pernambuco a Buenos Aires.

## *Zodariidae*

*53 — *Storena hirsuta* sp. n. Rio Negro.
*54 — *Storena major* (KEYSERLING), 1891. Santa Catarina e Paraná.
*55 — *Storena minor* (KEYSERLING), 1891. Santa Catarina e Paraná.

## *Theridiidae*

56 — *Argyrodes felix* CAMBRIDGE, 1880. Paraná.

57 — *Argyrodes jucundus* CAMBRIDGE, 1880. Comum desde a América Central até ao Rio Grande do Sul.

*58 — *Argyrodes striatus* KEYSERLING, 1891. Descrito do Espirito Santo. No Museu Nacional ha exemplares do Rio de Janeiro, Paraná (Rio Negro) e Rio Grande do Sul.

**59 — *Argyrodes triangularis* TACZANOWSKI, 1872. Guiana Francesa. FR. ZENO ROHR encontrou-a em Rio Negro.

*60 — *Argyrodes ululabilis* KEYSERLING, 1891. Rio Grande do Sul (KEYSERLING). Encontrei-a no Rio de Janeiro e FR. ZENO ROHR em Rio Negro.

61 — *Ariamnes longissimus,* KEYSERLING, 1891. Comum no sul do Brasil.

*62 — *Craspedisia cornuta* (KEYSERLING), 1891. Descrita de Friburgo — Rio de Janeiro. FR. ZENO ROHR encontrou-a em Rio Negro — Paraná.

*63 — *Dipoena cordiformis* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

*64 — *Dipoena foliata* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

*65 — *Euryopis floricola* KEYSERLING, 1886. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

*66 — *Euryopis pumicata* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

*67 — *Euryopis pusilla* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

*68 — *Euryopis variabilis* KEYSERLING, 1886. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

*69 — *Hetschkia gracilis* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

*70 — *Janulus germaini* SIMON, 1895. Paraguai e Paraná.

*71 — *Lithyphantes iheringi* KEYSERLING, 1886. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

*72 — *Lithyphantes vittatus* KEYSERLING, 1884. Paraguai, Minas Gerais, S. Paulo e Paraná.

*73 — *Rhomphaea altissima* sp. n. Rio Negro.

**74 — *Rhomphaea spinicauda* (KEYSERLING), 1884 (*Ariamnes spinicauda* KEYSERLING). Descrita do Perú. FR. ZENO ROHR colheu-a em Rio Negro.

*75 — *Spintharus gracilis* KEYSERLING, 1886. Descrita de Santa Catarina. Ha no Museu Nacional abundantes exemplares do Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul.

76 — *Steatoda brasiliana* KEYSERLING, 1884. Comum desde o Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul.

*77 — *Steatoda rubra* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

78 — *Teutana grossa* (C. KOCH), 1838. Cosmopolita tropical.

**79 — *Theridion alacre* KEYSERLING, 1884. Descrito da Colombia. LANGE DE MORRETES encontrou-a em Coritiba.

*80 — *Theridion bentificum* KEYSERLING, 1891. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

81 — *Theridion calycinatum* HOLMBERG, 1875. Toda a América Meridional.

*82 — *Theridion decoloratum* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

*83 — *Theridion evexum* KEYSERLING, 1884. Desde o México até o Paraná.

**84 — *Theridion giganteum* KEYSERLING, 1884. Descrito do Perú. LANGE DE MORRETES coligiu-a em Cachoeirinha.

85 — *Theridion ignotum* (KEYSERLING), 1884. Desde a Guiana Francesa até ao Rio Grande do Sul.

*86 — *Theridion impegrum* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.
*87 — *Theridion perniciosum* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.
88 — *Theridion pigrum* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.
*89 — *Theridion pingue* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.
90 — *Theridion rubiginosum* KEYSERLING, 1884. Paraná.
*91 — *Theridion sexmaculatum* KEYSERLING, 1884. De Guatemala até Santa Catarina.
92 — *Theridion studiosum* HENTZ, 1850. Toda a região Neotrópica.
93 — *Theridion tepidariorum* C. KOCH, 1841. Cosmopolita.
94 — *Theridion triguttatum* KEYSERLING, 1891. Desde o Espírito Santo até ao Rio Grande do Sul.
95 — *Theridion undatum* (KEYSERLING), 1884. Todo o Brasil.
*96 — *Theridula multiguttata* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.
97 — *Theridula opulenta* (WALCKENAER), 1837. Cosmopolita.
*98 — *Theridula sexpupillata* sp. n. Rio Negro.
99 — *Thwaitesia adamantifera* KEYSERLING, 1884. Perú, Argentina. Comum no Brasil Meridional desde o Espírito Santo até ao Rio Grande do Sul.
**100 — *Thwaitesia splendida.* Descrita de Colombia. Encontrei-a no Rio de Janeiro e LANGE DE MORRETES em Curitiba.
101 — *Tidarren fordum* (KEYSERLING), 1884. Do Sul dos Estados Unidos até a Argentina.
102 — *Tidarren passivum* (KEYSERLING), 1891. Do Espírito Santo até ao Rio Grande do Sul.
*103 — *Trithena cribrata* SIMON, 1893. Paraguai (SIMON), Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.
*104 — *Umfila granulata* KEYSERLING, 1886. Paraná e Santa Catarina.

## *Argiopidae*

105 — *Acacesia foliata* (HENTZ), 1847. Comum em toda a América.
*106 — *Anapis hetschkoi* (KEYSERLING), 1886. Paraná e Santa Catarina.
107 — *Actimosoma pentacanthum* (WALCKENAER), 1837. Comum em toda a América do Sul Cisandina.
108 — *Argiope argentata* (FABRICIUS). 1775. Comum do Sul dos Estados Unidos á Patagonia.
109 — *Argiope trifasciata* (FORSKAAL), 1775. Cosmopolita tropical.
110 — *Cardimius eximius* MELLO-LEITÃO, 1939. Rio Negro.
111 — *Cercidia versicolor* KEYSERLING, 1877. Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina (Birabé).
**112 — *Cyclosa conigera* F. CAMBRIDGE, 1903. Descrita do México: coligiu-a FR. ZENO ROHR em Rio Negro.
113 — *Cyclosa paranensis* MELLO-LEITÃO, 1937. Coritiba.
*114 — *Drexellia latro* (FABRICIUS), 1775. Do Rio de Janeiro até a Provincia de Buenos Aires.
*115 — *Eriophora bistriata* (RENGGER), 1836. Comum no Sul do Brasil e Paraguai.
116 — *Eriophora edax* (BLACKWALL), 1863. Comum desde a América Central até o Rio Grande do Sul.

**117 — *Eustala anastera* (WALCKENAER), 1837. No Museu Nacional ha exemplares do rio Cuminá — Pará, Tapera — Pernambuco, Distrito Federal, Serro Azul — Rio de Janeiro, Paranaguá — Paraná e Porto Alegre — Rio Grande do Sul.

*118 — *Eustala gonygaster* (C. KOCH), 1849. Descrita do Brasil sem indicação de localidade. Encontrada em Pernambuco (D. BENTO PICKEL). LANGE DE MORRETES colheu-a em Paranaguá.

*119 — *Eustala seditiosa* (KEYSERLING), 1892. Descrita do Rio Grande do Sul. LANGE DE MORRETES colheu-a em Cachoeirinha.

120 — *Eustala taquara* (KEYSERLING), 1892. Comum desde o Espirito Santo até ao Rio Grande do Sul.

121 — *Eustala ulecebrosa* (KEYSERLING), 1892. Comum no Brasil Meridional ao sul de S. Paulo.

122 — *Eustala vegeta* (KEYSERLING), 1865. Comum em todo o Brasil.

123 — *Gasteracantha kochi* BUTLER, 1873. Muito comum em todo o Brasil.

*124 — *Gnolus unipunctatus* (SIMON), 1893. Descrito de Minas Gerais. LANGE DE MORRETES encontrou-a em Curitiba.

**125 — *Leucauge acuminata* (CAMBRIDGE), 1889. Descrita da América Central. LANGE DE MORRETES coligiu-a em Serro Azul.

*126 — *Leucauge argyra* (WALCKENAER), 1837. Curitiba.

**127 — *Leucauge fragilis* (CAMBRIDGE), 1889. Descrita da América Central. LANGE DE MORRETES coligiu-a em Cachoeirinha.

*128 — *Leucauge turbida* (KEYSERLING), 1893. Descrita do Rio de Janeiro. No Museu Nacional ha exemplares de varias localidades do Rio de Janeiro, de Caxambú — Minas Gerais, Curitiba — Paraná e de Porto Alegre — Rio Grande do Sul.

*129 — *Leucauge uberta* (KEYSERLING), 1893. Descrita do Rio de Janeiro. Encontrei-a em Caxambú — Minas Gerais, e LANGE DE MORRETES em Curitiba.

*130 — *Mahadeva undulata* KEYSERLING, 1892. Comum desde o Paraná até a Argentina.

*131 — *Mangora strenua* (KEYSERLING), 1892. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

**132 — *Meta nigrovittata* KEYSERLING, 1865. Descrita da Colombia. FR. ZENO ROHR coligiu-a em Rio Negro e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre — Rio Grande do Sul.

133 — *Metazygia gregalis* (CAMBRIDGE), 1889. Comum em toda a região Neotrópica.

*134 — *Metazygia unguiformis* (KEYSERLING), 1879. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

**135 — *Metepeira bogotensis* (KEYSERLING), 1863. Descrita da Colombia. LANGE DE MORRETES coligiu-a em Curitiba.

136 — *Metepeira glomerabilis* (KEYSERLING), 1892. Desde o Espírito Santo ao Rio Grande do Sul.

137 — *Metepeira labyrinthea* (HENTZ), 1847. Comum em toda a América.

138 — *Metepeira lathyrina* (HOLMBERG), 1875. Do Rio de Janeiro á Patagonia.

*139 — *Micrathena annulata* REIMOSER, 1916. LANGE DE MORRETES coligiu-a em Paranaguá.

**140 — *Micrathena bullata* (WALCKENAER), 1841. Descrita de Caiena. Coligiu-a LANGE DE MORRETES em Curitiba.

141 — *Micrathena crassispina* (C. KOCH), 1836. Do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul.

**142 — *Micrathena duodecimspinosa* (CAMBRIDGE), 1890. Descrita da América Central. Coligiu-a LANGE DE MORRETES em Antonina.

*143 — *Micrathena excavata* (C. KOCH), 1836. Da Venezuela a Santa Catarina.

*144 — *Micrathena henseli* REIMOSER, 1916. Descrita do Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Encontrei-a em Niteroi — Rio de Janeiro e LANGE DE MORRETES em Curitiba.

*145 — *Micrathena kirbyi* (PERTY), 1833. Das Guianas até Curitiba (LANGE).

*146 — *Micrathena miles* SIMON, 1896. Descrita do Amazonas. LANGE DE MORRETES coligiu-a em Cachoeirinha.

*147 — *Micrathena sordida* (TACZANOWSKI), 1872. Encontrada em Caiena, Bolivia, Paraguai, Minas Gerais, S. Paulo, Paraná (Curitiba) e Santa Catarina.

*148 — *Micrathena triangularis* (C. KOCH), 1836. No Museu Nacional ha varios exemplares de Petropolis — Rio de Janeiro; Curitiba — Paraná e Joinville — Santa Catarina.

*149 — *Micrathena tucumana* SIMON, 1897. Argentina, Rio Grande do Sul e Paraná.

150 — *Neoscona nautica* (L. KOCH), 1875. Cosmopolita tropical.

151 — *Nephila clavipes* (LINNAEUS), 1758. Muito comum em toda a América tropical e subtropical.

152 — *Parepeira albostriata* (KEYSERLING), 1865. Desde a Colombia até Buenos Aires. Todo o Brasil.

153 — *Parepeira deliciosa* (KEYSERLING), 1892. Do Espírito Santo até Santa Catarina.

154 — *Parawixia audax* BLACKWALL, 1863. Muito comum em toda a América tropical e subtropical.

155 — *Verrucosa alticeps* (KEYSERLING), 1879. Do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul.

156 — *Verrucosa meridionalis* (KEYSERLING), 1892. De Pernambuco ao Rio Grande do Sul.

*157 — *Wagneriana minutissima* sp. n. Rio Negro.

158 — *Wagneriana undecimtuberculata* (KEYSERLING), 1865. Do Sul dos Estados Unidos até o Uruguai.

*159 — *Wixia citrina* (KEYSERLING), 1892. Do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul.

160 — *Wixia grayi* (BLACKWALL), 1863. Comum no Brasil Meridional e Uruguai.

*161 — *Wixia lucida* (KEYSERLING), 1883. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

*162 — *Wixia rostratula* (KEYSERLING), 1892. Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

163 — *Wixia rubellula* (KEYSERLING), 1892. Do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul.

164 — *Wixia trispinosa* (KEYSERLING), 1892. Do Rio de Janeiro ao Uruguai.

165 — *Zilla melanocephala* TACZANOWSKI, 1875. Da Guiana Francesa ao Rio Grande do Sul.

*166 — *Zilla rogenhoefferi* KEYSERLING, 1877. Descrita do Brasil sem indicação de localidade. Coligiu-a LANGE DE MORRETES em Cachoeirinha.

### *Ctenidae*

167 — *Ctenus lagesicola* STRAND, 1910. Santa Catarina e Paraná.

168 — *Ctenus longipes* KEYSERLING, 1891. Comum de Pernambuco ao Rio Grande do Sul.

169 — *Ctenus ornatus* (KEYSERLING), 1876. Comum de Pernambuco ao Paraná.

*170 — *Enoploctenus germaini* SIMON, 1896. Do Rio de Janeiro ao Paraná (Cachoeirinha).

171 — *Gephyroctenus philodromoides* MELLO-LEITÃO, 1936. Paranaguá.

172 — *Isoctenus eupalaestrus* MELLO-LEITÃO, 1936. Paranaguá.

*173 — *Odo similis* KEYSERLING, 1891. Descrito de Friburgo. Encontrei-a no Distrito Federal, OTON LEONARDOS em Iguape — S. Paulo e LANGE DE MORRETES em Curitiba.

174 — *Phoneutria nigriventer* (KEYSERLING), 1891. Comum no Brasil Meridional.

### *Eusparassidas*

*175 — *Olios attractus* PETRUNKEVITCH, 1911. Descrito do Rio de Janeiro. FR. ZENO ROHR coligiu-a em Rio Negro.

*176 — *Olios gracilipes* TACZANOWSKI, 1872. Descrito de Caiena. Encontrei-a no Rio de Janeiro, LANGE DE MORRETES em Cachoeirinha e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre.

*177 — *Polybetes pithagoricus* (HOLMBERG), 1874. Muito comum na Argentina, Uruguai e sul do Brasil até S. Paulo.

### *Thomisidae*

178 — *Misumenoides nigromaculatus* (KEYSERLING), 1880. Comum no Brasil Meridional.

179 — *Misumenops celer* (HENTZ), 1847. Comum no sul do Brasil.

**180 — *Misumenops exanthematicus* (HOLMBERG), 1881. Comum na Argentina. FR. ZENO ROHR coligiu-a em Rio Negro e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre.

181 — *Misumenops pallens* (KEYSERLING), 1880. Muito comum em toda a região Neotrópica.

182 — *Misumenops pallidus* (KEYSERLING), 1880. Igualmente muito comum.

183 — *Onocolus echinatus* (TACZANOWSKI), 1872. Da Venezuela até ao Rio Grande do Sul.

*184 — *Onocolus infelix* sp. n. Rio Negro.

*185 — *Onocolus simoni* MELLO-LEITÃO, 1915. Conhecida do Perú, Amazonas, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro e S. Paulo. FR. ZENO ROHR a coligiu em Rio Negro.

*186 — *Runcinioides argenteus* MELLO-LEITÃO, 1929. Descrita de Petropolis. Coligiu-a LANGE DE MORRETES em Curitiba.

*187 — *Sidyma lucida* (KEYSERLING), 1880. LANGE DE MORRETES colheu-a em Cachoeirinha.

188 — *Synaema bipunctatum* (TACZANOWSKI), 1872. Comum no Brasil Meridional.

*189 — *Synaemops notabilis* sp. n. Rio Negro.

*190 — *Titidius albiscriptus* sp. n. Rio Negro.
*191 — *Titidius curvilineatus* sp. n. Rio Negro.
192 — *Tmarus albolineatus* KEYSERLING, 1880. Comum do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul.
*193 — *Tmarus caxambuensis* MELLO-LEITÃO, 1929. Descrito de Caxambú. Colheu-a LANGE DE MORRETES em Cachoeirinha.
*194 — *Tmarus ignotus* MELLO-LEITÃO, 1929. Descrito de Petropolis. Colheu-a ZENO ROHR em Rio Negro.
*195 — *Tmarus pleuronotatus* sp. n. Cachoeira.
*196 — *Tobias caudatus* MELLO-LEITÃO, 1929. Descrito do Rio de Janeiro. Coligiu-a FR. ZENO ROHR em Rio Negro.

## *Selenopidae*

*197 — *Selenops cocheleti* SIMON, 1880. Descrita do Paraguai. Coligiu-a LANGE DE MORRETES em Curitiba.

## *Gnaphosidae*

198 — *Eilica modesta* KEYSERLING, 1891. Paraná e Santa Catarina.

## *Clubionidae*

*199 — *Castaneira brevis* KEYSERLING, 1891. Descrita do Rio de Janeiro. Encontrei-a em Petrópolis e Pinheiro — Rio de Janeiro; LANGE DE MORRETES em Cachoeira — Paraná e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre — Rio Grande do Sul.
*200 — *Ceto lineolata* sp. n. Rio Negro.
201 — *Chiracanthium subflavum* (BLACKWALL), 1862. Comum em toda a região Neotrópica.
202 — *Corinna flavipes* (KEYSERLING), 1891. Muito comum no Brasil, desde a Paraíba do Norte até o Rio Grande do Sul, encontrada também em Goiás.
*203 — *Corinna inermis* (BERTKAU), 1880. Descrita de Petrópolis. Recebi-a de Ouro Preto — Minas Gerais e de Curitiba — Paraná.
204 — *Corinna loricata* (BERTKAU), 1880. Comum desde a Paraíba do Norte até o Rio Grande do Sul.
205 — *Corinna nitens* (KEYSERLING), 1891. Com o mesmo habitat da anterior.
*206 — *Corinna selysii* (BERTKAU), 1880. Descrita de Minas Gerais. Colhi-a em Petrópolis e Pinheiro — Rio de Janeiro, e FR. ZENO ROHR em Rio Negro — Paraná.
*207 — *Diestus alticeps* (KEYSERLING), 1891. Descrito do Espírito Santo. PADBERG encontrou-a em Itatiaia, LANGE DE MORRETES em Curitiba e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre.
208 — *Myrmecium camponotoides* MELLO-LEITÃO, 1932. Espirito Santo e Paraná.
**209 — *Trachelopachys cingulipes* (SIMON), 1886. Comum na Argentina. Colheu-a LANGE DE MORRETES em Curitiba.

## *Lyssomanidae*

*210 — *Lyssomanes austerus* PECKHAM, 1888. Descrito do Rio de Janeiro. Encontrei-a na Tijuca. FR. ZENO ROHR em Rio Negro — Paraná e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre.

**211 — *Lyssomanes bitaeniatus* PECKHAM, 1888. Descrita da Venezuela. FR. ZENO ROHR encontrou-a em Rio Negro — Paraná e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre — Rio Grande do Sul.

*212 — *Lyssomanes nigrofimbriatus* sp. n. Rio Negro.

## *Salticidae*

*213 — *Akela penicillium* sp. n. Cachoeirinha.

*214 — *Amycus australis* sp. n. Curitiba.

215 — *Arindas ornatus* MELLO-LEITÃO, 1933. Rio Negro.

*216 — *Paranaia fuscimana* gen. nov. sp. n. Curitiba.

217 — *Sarinda mariana* MELLO-LEITÃO, 1933. Curitiba.

*218 — *Simonella atrogaster* sp. n. Rio Negro.

**219 — *Simonella bicolor* PECKHAM, 1892. Descrita da América Central; encontrou-a FR. ZENO ROHR em Rio Negro.

220 — *Simonella claustrorum* MELLO-LEITÃO, 1933. Rio Negro.

221 — *Synemosyna lauretta* PECKHAM, 1892. Comum em todo o Brasil.

## *Segestriidae*

*222 — *Ariadna conspersa* sp. n. Curitiba.

**223 — *Ariadna mollis* (HOLMBERG), 1876. Muito comum na Argentina. Encontrou-a PADBERG no Itatiaia — Rio de Janeiro; LANGE DE MORRETES em Itapiranga e Curitiba — Paraná, e FR. ZENO ROHR em Rio Negro.

## *Anyphaenidae*

*224 — *Anyphaena clavipes* MELLO-LEITÃO, 1922. Descrita de Mendes — Rio de Janeiro. Encontrou-a FR. ZENO ROHR em Rio Negro.

*225 — *Aysha prospera* KEYSERLING, 1891. Descrita do Rio Grande do Sul. Encontrou-a LANGE DE MORRETES em Curitiba e OTHON LEONARDOS em Ipiranga — S. Paulo.

226 — *Gayenna maculatipes* (KEYSERLING), 1878. Especie muito comum na Argentina e Brasil Meridional, até S. Paulo.

*227 — *Gayenna tripunctata* sp. n. Rio Negro.

*228 — *Osoriella punctata* (KEYSERLING), 1891. Descrita de Friburgo. Encontrou-a FR. ZENO ROHR em Rio Negro — Paraná e o PE. PIO BUCK em Porto Alegre — Rio Grande do Sul.

*229 — *Tasata tigris* sp. n. Rio Negro.

**230 — *Tomopisthes taeniatus* SIMON, 1886. Descrita da Patagonia. Encontrada em Curitiba — Paraná por LANGE DE MORRETES.

## *Senoculidae*

**231 — *Senocolus darwini* (HOLMBERG), 1883. Descrita do Chaco argentino; encontrou-a LANGE DE MORRETES em Curitiba.

*232 — *Senocolus purpureus* (SIMON), 1880. Comum desde a Venezuela até o Paraná, onde LANGE DE MORRETES a encontrou em Curitiba.

## ESPÉCIES NOVAS

### *Arocha rochai* sp. n.

♀ — 5 mm.

| Patas | Femur | Patela-tibia | Protarso | Tarso | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 4 | 5,2 | 4,2 | 1,6 | 15 mm. |
| II | 3,4 | 3,6 | 3 | 1,4 | 11,4 mm. |
| III | 2,5 | 2 | 1,5 | 1 | 7 mm. |
| IV | 2,8 | 2,8 | 2 | 1,2 | 8,8 mm. |

Cefalotorax mais longo que largo, semelhante no aspecto ao cefalotorax de *Gelanor*. Olhos posteriores em fila procurva, os médios separados um diâmetro e a dois diâmetros dos laterais. Olhos anteriores em fila direita, iguais, os médios separados um diâmetro e um pouco mais afastados dos laterais. Area dos olhos médios de altura e largura iguais, um pouco mais larga adiante. Os olhos médios anteriores negros; os outros claros. Clípeo mais alto que a área dos olhos médios. Quelíceras maiores que a altura da face (clípeo mais a area dos olhos médios), maiores que as lâminas e verticais e paralelas. Peça labial mais longa que larga, afilando-se para a extremidade livre, ultrapassando o meio das lâminas. Esterno terminando atrás em ponta aguda. Abdomen mais longo que largo, com dois grandes tubérculos pontudos, dirigidos para fora, ao nivel do terço médio.

Cefalotorax testáceo, com larga faixa mediana parda e tres manchas pardas de cada lado. Patas testáceas irregularmente manchadas de pardo. Abdomen cinzento-escuro, com tres grandes manchas brancas anteriores e com alguns pontos carmesins. Atrás dos tubérculos o abdomen é mais claro e ornado, de cada lado, de duas manchas brancas. Ancas testáceas. Peça labial e lâminas maxilares pardo-escuras. Ventre branco, reticulado de cinzento.

Epigino mais longo que largo.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Col.: Fr. Zeno Rohr. Tipo: N.º 58083 do M. N.

### *Trechalea limai* sp. n. (Figs. 1-2)

Corpo: 11 mm.

Olhos posteriores grandes, em fila recurva, iguais, os médios um pouco mais afastados dos laterais que entre si. Olhos anteriores em fila menos recurva e muito mais estreita, os médios maiores, quasi equidistantes. Clípeo muito obliquo, um pouco mais alto que a metade da area dos olhos médios. Cefalotorax mais longo que largo, regularmente curvo dos lados, em seus dois terços posteriores, com o sulco torácico longo e profundo. Abdomen oval curto, um pouco mais dilatado para trás. Tibias I e II com cinco pares de espinhos inferiores, um de cada lado e 1-1-1 dorsais; protarsos com tres pares inferiores e 1-1 de cada lado.

Epigino mais largo que longo, mais dilatado em sua porção proximal, com duas cristas quitinosas espiraladas, sem lingueta mediana.

Palpo do macho de femur robusto, com tres robustos espinhos dorsais e um apical interno; patela pouco mais longa que larga, dilatada distalmente; tibia bem

mais espessa que a patela, quasi tão larga como longa, com robusto espinho dorsal mediano e robusta apófise apical interna, dobrada em angulo reto, ponteaguda e com um forte espessamento basilar (fig. 1).

Cefalotorax pardo oliváceo com uma larga faixa marginal clara; olhos orlados de negro. Quelíceras fulvo-escuras, com uma faixa oblíqua denegrida. Patas amareladas, irregularmente manchadas de pardo. Abdomen pardo-oliváceo, com um grande desenho mais escuro que ocupa quasi todo o dorso.

Localidade tipo: Ribeira de Iguape. Col.: Dr. Othon Leonardos. Esta espécie e a anterior são dedicadas ao meu sábio amigo Prof. Rocha Lima.

### *Trechalea syntrechaloides* sp. n. (Fig. 3)

♀ — 11,5 mm.

| Patas | Femur | Patela-tibia | Protarso | Tarso | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 9 | 10 | 7 | 5,5 | 31,5 mm. |
| II | 8 | 10 | 7,5 | 5,5 | 31 mm. |
| III | 7,5 | 8 | 7 | 5,5 | 28 mm. |
| IV | 8 | 8,5 | 10,5 | 6,5 | 33,5 mm. |

Olhos posteriores grandes, em fila recurva, iguais e equidistantes, separados um do outro um diâmetro. Olhos anteriores em fila recurva, os médios maiores, afastados um diâmetro e a meio diâmetro dos laterais. Area dos olhos médios mais larga que longa, mais larga atrás, os olhos posteriores duas vezes maiores que os anteriores. Clípeo muito obliquo, igual á metade da area dos olhos médios. Cefalotorax mais largo que longo, regularmente curvo dos lados, de sulco torácico longo. Abdomen alongado, levemente dilatado no terço médio, pontudo atrás. Tibias I e II com sete pares de espinhos inferiores, os apicais muito menores, e um lateral no terço médio, muito próximo dos inferiores e 1-1 dorsais mais fracos; protarsos com 2-2-2-2-2 espinhos inferiores, mais um mediano e um lateral basal. Peça labial de ápice levemente convexo, alcançando o meio das lâminas, que são obliquas. Esterno mais largo que longo, pontudo atrás.

Epigino com lingueta mediana estreita, quasi paralela, um nada dilatada atrás.

Cefalotorax pardo, de área ocular fusca, os olhos orlados de negro. Quelíceras e peças bucais pardo-escuras. Esterno e ancas amarelos. Patas amarelas, manchadas de pardo-escuro. Abdomen pardo, com denso pontilhado branco num retículo pardo, sendo a faixa mediana de colorido uniforme, com algum sombreado negro atrás; lados manchados de negro; ventre testáceo com dois pontos fulvos; epigino fulvo.

Localidade tipo: Cachoeirinha.
Col.: F. Lange de Morretes.
Tipo: N.º 41476 do Museu Nacional.




Figs. 1-2 - *Trechalea limai*, n. sp.: 1 - vista dorsal; 2 - epigino. Fig. 3 - *T. syntrechaloides*, n. sp.: epigino.

*Oxyopes altifrons* sp. n.

♀ — 6,5 mm.

| Patas | Femur | Patela-tibia | Protarso | Tarso | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 2,8 | 3,3 | 2,5 | 1,3 | 9,9 mm. |
| II | 2,7 | 3,1 | 2,2 | 1,2 | 9,2 mm. |
| III | 2,5 | 2,7 | 1,6 | 0,8 | 7,6 mm. |
| IV | 2,6 | 2,6 | 2,5 | 1 | 8,7 mm. |

Cefalotorax paralelo. Olhos posteriores iguais, equidistantes, separados uns dos outros mais de dois diâmetros. Olhos anteriores dispostos em trapésio, os médios tres vezes menores que os laterais. Clípeo vertical mais alto que a area ocular. Queliceras estreitas, verticais, com a margem inferior do sulco armada de dois pequenissimos dentes. Abdomen de aspecto igual ao de *O. salticus*. Espinulação das patas mais robusta que nessa espécie.

Cefalotorax testáceo, com pelos esparsos, negros, vermelhos e brancos, formando manchas irregulares. Quelíceras do mesmo colorido do cefalotorax, com uma faixa longitudinal e pelos fulvos. Peças bucais negras ou pardas. Esterno amarelo e as ancas testáceas. Patas esverdeadas, revestidas de pêlos como os do cefalotorax; os espinhos negros. Abdomen revestido de pêlos sedosos, os lados muito negros e o dorso com larga faixa pardo-avermelhada com um desenho irregular negro, branco e vermelho. Ventre pardo-claro com duas linhas denegridas.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná.
Col.: Fr. Zeno Rohr.

*Storena hirsuta* sp. n.

♀ — 5,7 mm.

| Patas | Femur | Patela-tibia | Protarso | Tarso | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 1,5 | 1,8 | 1,2 | 0,8 | 5,3 mm. |
| II | 1,3 | 1,5 | 1,1 | 0,8 | 4,7 mm. |
| III | 1,2 | 1,3 | 1,1 | 0,8 | 4,4 mm. |
| IV | 1,5 | 1,7 | 1,5 | 1 | 5,7 mm. |

Cefalotorax baixo, estreito adiante, de região cefálica declive e com o sulco torácico remoto. Area ocular pequena e quasi circular. Olhos posteriores em fila fortemente procurva, os médios menores e subcontiguos, separados dos laterais um diâmetro. Olhos anteriores formando um trapézio (em fila fortissimamente recurva), os médios em linha reta com os laterais posteriores. Area dos olhos médios pouco mais alta que larga, paralela. Clípeo mais alto que a area ocular. Queliceras com as margens do sulco inermes, e armadas de garra curta. Peça labial mais longa que larga, afilando-se para a extremidade livre, quasi alcançando o ápice das lâminas, que são estreitadas para o ápice, inclinadas e de pequena escópula apical. Esterno largamente truncado adiante, terminando atrás em ponta, adiante das ancas IV. Tibias I com 2-2-2 fracos espinhos laterais inferiores e

mais uma fila mediana de 1-1-1-1-1; protarsos com 2-2 espinhos inferiores; nas tibias II falta a fila mediana inferior de espinhos. Patas posteriores (III e IV muito espinhosas). Abdomen oval alongado, revestido de numerosas cerdas erectas.

Cefalotorax liso e negro. Queliceras e peças bucais iguais ao cefalotorax. Patas pardas, de fêmures castanho-negros. Abdomen de dorso negro com um desenho branco constituido por duas manchas anteriores, uma faixa fortemente procurva, interrompida no meio, dois pontos e uma faixa curta e ainda mais procurva, no terço posterior. Ventre e fiandeiras castanho-escuros. Esterno castanho e ancas pardo-olivaceas, escuras.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Col.: Zeno Rohr.
Tipo: N.º 58285 do Museu Nacional.

*Rhomphaea altissima* sp. n.

♀ — 3,5 mm.
Altura do abdomen: 2,7 mm.

| Patas | Femur | Patela-tibia | Protarso | Tarso | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 6 | 5,4 | 3 | 1,3 | 15,7 mm. |
| II | 3,2 | 2,5 | 2,1 | 0,9 | 9,7 mm. |
| III | 1,7 | 1,3 | 1 | 0,6 | 4,6 mm. |
| IV | 4,7 | 2,7 | 2,6 | 0,9 | 10,9 mm. |

Cefalotorax baixo, plano, de sulco torácico largo, direito, transverso. Região ocular ocupando uma elevação mediana anterior. Olhos laterais anteriores e posteriores contiguos. Olhos posteriores em linha direita, os médios separados quasi tres diâmetros, contiguos aos laterais. Olhos anteriores em linha recurva, os médios bem maiores, separados um diâmetro e contíguos aos laterais. Area dos olhos médios tão alta quão larga, mais estreita atraz. Clípeo obliquo, mais alto que a area dos olhos médios. Abdomen altíssimo, elevado atraz em grande corno levemente curvo para traz.

Cefalotorax testaceo, com duas faixas marginais castanhas e duas faixas longitudinais continuadas no clípeo e nas quelíceras. Patas testáceas com linhas longitudinais castanhas. Lâminas testaceas, com uma linha marginal castanha formando um ângulo de vértice anterior. Esterno e peça labial castanhos; esta com a ponta clara, aquele com uma faixa mediana amarelada. Abdomen: dorso pardo e negro profusamente manchado de prateado; lados pardos, com grande mancha prateada apical e outra mancha negra basilar, esta com manchas prateadas; face posterior prateada, reticulada de pardo; ventre acinzentado, com uma linha castanha mediana e algumas manchinhas prateadas.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Col.: Zeno Rohr.
Tipo: N.º 58287 (M. N.)

*Theridula sexpupillata* sp. n.

♀ — 2 mm.

| Patas | Femur | Patela-tibia | Protarso | Tarso | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 2,5 | 2 | 1,7 | 0,5 | 6,7 mm. |
| II | 1,5 | 1,2 | 0,9 | 0,5 | 4,1 mm. |
| III | 1 | 0,7 | 0,6 | 0,4 | 2,7 mm. |
| IV | 1,4 | 1,2 | 0,9 | 0,4 | 3,9 mm. |

Olhos posteriores em linha direita, equidistantes, os médios menores. Cefalotorax mais largo que longo, de região cefálica muito estreita. Olhos anteriores em fila levemente procurva, os médios maiores, separados quasi dois diâmetros e subcontíguos aos laterais. Area dos olhos médios quadrada. Clípeo da altura da area dos olhos médios, levemente deprimido.

Cefalotorax amarelo claro. Patas amarelo-claras, com duas pequenas manchas escuras no ápice das tibias e das patelas. Abdomen cinzento-coccineo, com tres pares de manchas brancas, havendo em cada mancha branca uma outra, bem menor, denegrida. Ventre pardo-claro com uma linha em U muito aberto no terço médio e quatro pontos denegridos junto ás fiandeiras. Esterno, ancas, laminas maxilares e peça labial quasi brancos.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Col.: Fr. Zeno Rohr. Tipo: N.º 58284 (M. N.).

*Wagneriana minutissima* sp. n.

♀ — 1,5 mm.

Area dos olhos médios mais larga adiante que atrás. Abdomen com dois tubérculos anteriores e dois outros dorsais, menores.

Cefalotorax marmorado de branco e pardo. Patas com o terço basilar dos fêmures amarelo, a metade apical dos fêmures e as patelas negras, as tibias aneladas de fusco, os protarsos e tarsos amarelos pálidos. Abdomen branco, marmorado de azulado e castanho claro com as inserções musculares muito fundas. Esterno, peça labial e lâminas castanho-claros; ancas pardacentas. Ventre pardo claro. Palpos fulvos.

Localidade tipo: Rio Negro. Col.: Fr. Zeno Rohr. Tipo: N.º 58298.

*Onoculus infelix* sp. n.

♀ — 6,5 mm. Abdomen — 3,8 x 4,4 mm.

| Patas | Fémures | Patelas-tibias | Protarsos | Tarsos | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 3,3 | 3,6 | 1,8 | 1,3 | 10 mm. |
| II | 3,2 | 3,8 | 2 | 1,3 | 10,3 mm. |
| III | 1,6 | 1,8 | 1 | 0,6 | 5 mm. |
| IV | 1,6 | 1,8 | 1 | 0,6 | 5 mm. |

Cefalotorax plano, bruscamente estreitado adiante. Olhos posteriores em fila levemente procurva, os médios maiores, separados entre si quasi dois diâmetros e a um diâmetro dos laterais. Olhos anteriores em fila fortemente recurva, os médios muito menores, quasi equidistantes. Area dos olhos médios mais alta que larga, mais estreita adiante, os olhos anteriores um pouco menores. Clípeo de altura igual aos olhos anteriores. Fémures com filas de pequenos tubérculos espiníferos dorsais e 5-5 ventrais; as tibias com 2-2-2 espinhos inferiores na metade apical; protarsos com 2-2-2 um pouco maiores e mais robustos. Abdomen pentagonal, de ângulos anteriores salientes, lados posteriores convexos, o tubérculo posterior saliente, arredondado, grosso, com os angulos posteriores, laterais.

Epigino com duas fossetas circulares, separadas por estreita crista mediana.

Cefalotorax, palpos, patas, quelíceras, lâminas e labio amarelo-claros (provavelmente verdes no vivo). Dorso do abdomen amarelo, com duas fossetas negras; tubérculo posterior e lados posteriores pontilhados de negro; face ventral amarela uniforme; o tubérculo posterior, visto de baixo, é negro.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Col.: Fr. Zeno Rohr. Tipo: N.º 58426 do Museu Nacional.

*Synaemops notabilis* sp. n.

♂ — 4,5 mm.

Todo o dorso guarnecido de numerosos espinhos erectos, uns maiores, outros menores. Cefalotorax plano, bruscamente estreitado adiante. Olhos posteriores em fila recurva, os médios separados tres diâmetros e a mais de quatro diâmetros de distancia dos laterais. Olhos anteriores em fila mais recurva, os médios menores, separados entre si tres diâmetros e a dois diâmetros dos laterais. Area dos olhos médios pouco mais alta que larga, paralela, os olhos anteriores levemente menores. Olhos laterais anteriores maiores que os posteriores. Tibias I e II com um tufo inferior de grossas cerdas e a face anterior inferior com espinhos fracos; protarsos com 2-2-2-2 espinhos inferiores. Abdomen semelhante ao de Misumena.

Cefalotorax, quelíceras, palpos e patas anteriores, até as tibias, fulvo-escuros; o cefalotorax com duas faixas claras. Protarsos e tarsos anteriores e patas III e IV amarelas, com pequenas manchas rubras. Abdomen amarelo. Esterno e ancas III e IV amarelos; ancas I e II avermelhadas; peça lábial e lâminas maxilares pardas.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Tipo: N.º 58261 do Museu Nacional.

*Titidius albiscriptus* sp. n.

♀ — 5 mm.

| Patas | Fémures | Patelas-tibias | Protarsos | Tarsos | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 2 | 2 | 1 | 0,8 | 5,8 mm. |
| II | 2 | 2,2 | 1,1 | 0,8 | 6,1 mm. |
| III | 1,2 | 1,4 | 0,6 | 0,6 | 3,8 mm. |
| IV | 1,3 | 1,4 | 0,7 | 0,6 | 4 mm. |

Cefalotorax alto, de comprimento e largura quasi iguais. Olhos posteriores em fila recurva, os médios menores, separados entre si menos de tres diâmetros e a quasi quatro diâmetros dos laterais. Olhos anteriores em fila recurva, equidistantes, os médios duas vezes menores. Tubérculos laterais posteriores bem maiores que os tubérculos laterais anteriores. Area dos olhos médios muito mais alta que larga, os olhos iguais, mais estreita adiante. Clípeo vertical, igual á area de olhos médios. Abdomen curto, mais dilatado atraz, como o de *Misumena*. Tibias I e II com 2-2 espinhos inferiores e 1-1 de cada lado; protarsos com 2-2-2 inferiores mais robustos e 1-1 de cada lado.

Cefalotorax castanho, com desenho testáceo irregular; area ocular com duas linhas brancas obliquas; clípeo com uma linha transversal amarela. Patas amareladas, com manchas brancas e rubras, irregulares. Abdomen cinzento com tres manchas brancas na linha mediana e uma linha transversal sinuosa branca, entre as manchas anteriores. Quelíceras castanho-escuras, com estreita linha branca sub-apical. Esterno castanho. Lábio e lâminas pardo-escuras. Ventre branco com larga faixa mediana parda.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Tipo: N.° 58279.

*Titidius curvilineatus* sp. n.

♀ — 6 mm. ♂ — 3,5 mm.

| Patas | Fémures | Patelas-tibias | Protarsos | Tarsos | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 2,5 | 3,2 | 2,5 | 1,3 | 9,4 mm. |
| II | 2,5 | 3 | 2,4 | 1,3 | 9,2 mm. |
| III | 1,5 | 1,5 | 0,7 | 0,6 | 4,3 mm. |
| IV | 1,5 | 1,5 | 0,7 | 0,6 | 4,3 mm. |

Cefalotorax pouco mais alto que largo. Clípeo vertical, a porção posterior fortemente inclinada. Olhos posteriores em fila fortemente recurva, os médios menores, e um pouco mais separados. Olhos anteriores em fila direita, quasi equidistantes, os médios quasi tres vezes menores. Area dos olhos médios mais alta que larga, mais larga atrás, os olhos anteriores muito menores. Clípeo mais baixo que a area dos olhos médios. Patas do macho longas e delgadas, com robustos espinhos; patelas com um espinho anterior e um apical; tibias com 2-2 inferiores, 1-1-1 de cada lado e 1-1 dorsais; os protarsos com 2-2 espinhos inferiores e 1-1 de cada lado. Abdomen do macho alongado, paralelo, pontudo atraz; o da femea um pouco dilatado no terço posterior. Tegumentos com fortes cerdas.

Cefalotorax pardo-claro, com estreita faixa branca mediana. Clípeo com duas faixas brancas que partem dos olhos posteriores e se extendem até ao apice das quelíceras. Tubérculos oculares azulados. Esterno, ancas, peça labial e lâminas maxilares de tom testáceo. Abdomen cinzento, de sombreado carmezin e fusco, com estreita faixa mediana branca e com tres linhas brancas transversais, sendo uma anterior, curva para trás, uma média sinuosa e uma posterior quasi direita, todas nos tres quintos médios, e orladas de negro ou cochonilha; ventre acinzentado com duas faixas brancas.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Tipo: N.° 58185 no Museu Nacional.

*Tmarus pleuronotatus* sp. n.

♀ — 7 mm.

| Patas | Fémures | Patelas-tibias | Protarsos | Tarsos | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 3,5 | 4,3 | 2,2 | 1,3 | 11,3 mm. |
| II | 3,3 | 4 | 2,2 | 1 | 10,5 mm. |
| III | 1,7 | 2 | 0,8 | 0,7 | 5,2 mm. |
| IV | 2 | 2,1 | 0,8 | 0,7 | 5,6 mm. |

Clípeo muito proclive, quasi horizontal, com seis cerdas na borda livre. Olhos posteriores em linha recurva, quasi equidistantes, os médios menores. Olhos anteriores equidistantes, em linha reta, os médios menores. Area dos olhos médios nitidamente mais larga que alta, os olhos anteriores menores. Tibias anteriores armadas de 2-2-2 espinhos inferiores, 1-1 de cada lado e 1-1 dorsais; protarsos com 2-2-2-2-2 espinhos inferiores, 1-1 de cada lado; tibias II com 2-2 espinhos inferiores, 1-1-1 de cada lado e 1-1 dorsais; protarsos como os anteriores. Abdomen alongado, pouco elevado atrás em um tubérculo mediano.

Cefalotorax castanho-claro; o declive posterior e lados esbranquiçados; no dorso tres linhas brancas; na area ocular e no clípeo denso pontilhado vermelho. Patas testáceas. Esterno, peça labial e lâminas maxilares e ancas testáceas, manchadas de branco. Abdomen cinzento claro, com cerdas erectas, esparsas, em pontos negros; lados da mesma côr do dorso, com grande mancha castanho-escura perto do declive posterior; face ventral com uma faixa longitudinal mediana cinzenta. Epigino negro.

Localidade tipo: Cachoeira — Paraná. Col.: F. LANGE. Tipo: N.º 58264, no Museu Nacional.

*Ceto lineolata* sp. n.

♂ — 3,2 mm.

Cefalotorax baixo, chagriné, com sulco torácico pequeno e remoto. Olhos posteriores formando uma linha recurva, iguais, os médios separados entre si menos de um diâmetro, e a um diâmetro dos laterais. Olhos anteriores em linha reta, contiguos e iguais. Area dos olhos médios mais alta que larga, mais estreita adiante. Peça labial pouco mais longa que larga, apenas ultrapassando o meio das lâminas maxilares. Patas inermes. Abdomen oval, sem escudo. Palpos sem apófise.

Cefalotorax, quelíceras, palpos, patas, peça labial, lâminas maxilares, ancas e esterno côr de mogno. Abdomen cinzento escuro, com denso pontilhado mais claro; na metade posterior cinco delgadas linhas paralelas, recurvas, claras.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Tipo: N.º 58289, no Museu Nacional.

*Lyssomanes nigrofimbriatus* sp. n.

♂ — 7 mm.

| Patas | Fémures | Patelas-tibias | Protarsos | Tarsos | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 3,3 | 4 | 3 | 0,7 | 11 mm. |
| II | 2,6 | 3,2 | 2,5 | 0,6 | 8,9 mm. |
| III | 2,6 | 2,8 | 2,5 | 0,7 | 8,6 mm. |
| IV | 2,7 | 2,8 | 2,8 | 0,8 | 9,1 mm. |

Cefalotorax pouco estreitado adiante, com o sulco torácico logo atrás dos olhos posteriores, longo e profundo. Olhos da segunda linha mais afastados que os anteriores. Area dos olhos dorsais um terço mais larga que longa. Tibias e protarsos anteriores muito longos, com uma densa fimbria dorsal e ventral de longos pêlos negros, ocupando toda a extensão desses dois segmentos; as tibias armadas de 2-2-2 longos espinhos inferiores, 1-1 maiores, erectos, do lado externo e 1-1 dorsais; protarsos com 2-2 espinhos inferiores e 1-1 de cada lado. Tibias e protarsos II sem fimbria pilosa, as tibias armadas de 2-2-2 espinhos inferiores, 1 de cada lado e 1 dorsal; protarsos com 2-2 inferiores e 1-1 laterais; patelas I e II com espinho apical. Abdomen alongado, pontudo atrás. Quelíceras com tres pequenos dentes separados na margem inferior do sulco ungueal e dois na margem superior. Esterno muito largo adiante. Peça labial mais longa que larga, excedendo o meio das lâminas maxilares. Protarsos I e II levemente curvos.

Cefalotorax pardo, com larga faixa escura mediana, a região cefálica pardo-escura, com os olhos orlados de negro e os longos pêlos sedosos da região cefálica vermelho-alaranjado. Patas anteriores pardas, com as fimbrias negras e as tibias amarelas. Patas II pardas uniformes; patas III e IV esbranquiçadas. Esterno e ancas brancos, amarelados. Peça labial e lâminas maxilares castanhas. Abdomen branco com escassa pubescencia trigueira.

Fémur dos palpos com uma fimbria apical; patela de comprimento e largura iguais, com pequeno pincel apical dorsal e ventral; tibia com densa fimbria maior que a da patela; tarso maior que a tibia com a patela com pequena apófise basilar, bulbo muito irregular, com curto estilete sinuoso.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Tipo: N.º 58263 no Museu Nacional.

*Amycus australis* sp. n.

♀ — 4,5 mm.

Area ocular mais estreita atrás. Olhos anteriores em fila recurva, os médios tres vezes maiores que os laterais. Tibias anteriores armadas de 2-2-2 espinhos inferiores e os protarsos de 2-2-2-2-2. Tibias III e IV com tres verticilos de espinhos e os protarsos com dois.

Cefalotorax pardo, olhos postos em manchas denegridas; clípeo com grande mancha de pêlos brancos; região torácica de margens denegridas. Todo o cefalotorax revestido de pêlos brancos espatulados pouco densos. Patas I e II como o cefalotorax; patas III e IV amareladas. Quelíceras, peça labial e lâminas maxilares pardo-escuras. Esterno pardo-claro. Abdomen pardo com dois pares de man-

chas de pêlos brancos na porção anterior do dorso; atrás dessas manchas brancas ha duas denegridas; na metade posterior ha tres pares de manchas alongadas denegridas. Ventre denegrido.

Localidade tipo: Curitiba. Col.: Fr. Zeno Rohr. Tipo: No Museu Nacional, n.º 18368.

Genero *Paranaia* gen. nov.

Cefalotorax baixo, longo, levemente deprimido entre os olhos, com o sulco torácico conspícuo, pouco atrás dos olhos posteriores. Area ocular mais longa que larga, paralela, tão longa como a região torácica. Olhos anteriores formando uma linha levemente recurva. Olhos intermediários duas vezes mais afastados dos posteriores que dos laterais anteriores. Clipeo retro-obliquo, as quelíceras situadas atrás dos olhos laterais anteriores. Quelíceras curtas, verticais, de margem inferior do sulco ungueal unidentada. Esterno longo, pontudo atrás, largamente truncado adiante. Peça labial tão longa quão larga, não atingindo o meio das lâminas. Estas são fortemente dilatadas distalmente. Abdomen quasi cilíndrico, de fiandeiras curtas, subterminais. Patas I e II de tibias armadas de 2-2-2 robustos espinhos inferiores e sem espinhos laterais; os protarsos armados de 2-2 espinhos inferiores. Patas III e IV inermes. Tipo:

*Paranaia fuscimana* sp. n.

♀ — 3,5 mm.

Cefalotorax castanho, com manchas oculares negras e alguns pêlos brancos em torno dos olhos anteriores. Quelíceras, peça labial, lâminas maxilares e patas amarelo-claras; as patas anteriores com uma faixa denegrida na face anterior dos fémures, patelas tibias e protarsos. Esterno amarelo com uma linha denegrida mediana. Abdomen pardo-claro, com uma larga faixa mediana negra, em cuja metade anterior ha estreita faixa testácea, e mais duas largas faixas testáceas, cortadas por duas linhas negras, obliquas; lados negros; ventre testáceo.

Hab.: Curitiba. Col.: F. Lange. Tipo: no Museu Nacional, n.º 14233.

*Akela penicillium* sp. n.

♀ — 3,5 mm.

Tibias I e II com 2-2 espinhos inferiores e 1-1 de cada lado; os protarsos com 2-2 espinhos inferiores. Patas IV com dois verticilos nos protarsos.

Corpo castanho; esterno negro; quelíceras pardo-escuras. Peça labial e lâminas castanhas de pontas claras. Patas amarelas. Abdomen revestido de escamas amarelo-pálidas dos lados. Fiandeiras com densos tufos de escamas negras.

Hab.: Cachoeirinha. Tipo: N.º 14191 no Museu Nacional.

*Simonella atrogaster* sp. n.

♀ — 2,5 mm.

Cefalotorax como nas outras espécies. Abdomen oval alongado sem constricção.

Cefalotorax castanho escuro, os olhos em pequenas manchas negras, a região torácica com estreita faixa amarela, obliqua, na constricção. Abdomen negro com dois pontos claros na porção anterior do dorso. Patas anteriores amarelas com linhas negras sobre a tibia e protarso. Patas amarelas, claras. Patas III e IV com os fémures, patelas e quatro quintos da tibia castanho, o resto amarelo pálido. Peça labial e lâminas maxilares amarelas. Esterno amarelo na metade anterior, castanho na posterior. Ancas I, II e IV amarelas; ancas III castanhas.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Col.: FR. ZENO ROHR. Tipo: No Museu Nacional, n.º 58290.

*Ariadna conspersa* sp. n.

♀ — 8 mm.

Cefalotorax longo, paralelo. Olhos médios contiguos, separados dos laterais cerca de dois diâmetros. Olhos laterais contiguos, os anteriores um pouco para dentro dos posteriores. Os tres tubérculos iguais. Clípeo mais alto que a area ocular. Quelíceras com a margem inferior inerme e a superior com tres pequenos dentes. Peça labial estreita, paralela, duas vezes mais longa que larga, ultrapassando o meio das lâminas, que são estreitas, paralelas. Esterno duas vezes mais longo que largo, pouco estreitado adiante. Patas I e II de fémures com dois espinhos sub-apicais internos; tibias com 2-2-2-2 espinhos inferiores e protarsos com 2-2-2-2-2-2; tarsos escopulados. Tarsos e protarsos com longa fimbria de pêlos sedosos, fimbria que aparece também no ápice dos fémures e na metade apical das patelas. Patas III e IV com os tarsos e ápice dos protarsos escopulados. Cefalotorax quasi nú. Abdomen oval alongado, revestido de pêlos sedosos.

Cefalotorax fulvo-escuro, a região cefálica ainda mais escura. Patas côr de mogno. Esterno e lâminas côr de mogno; peça labial fulvo-negra. Abdomen denegrido; ventre de colorido uniforme; dorso com um U amarelo claro de concavidade posterior, ocupando o quinto anterior; seguem-se tres pares de grandes manchas, que limitam na metade anterior uma faixa mediana denteada. O desenho do abdomen e as fimbrias das patas anteriores permitem reconhecer facilmente esta espécie.

Localidade tipo: Curitiba. Col.: LANGE DE MORRETES. Tipo: N.º 14087 do Museu Nacional .

*Gayenna tripunctata* sp. n.

♀ — 7 mm.

| Patas | Fémures | Patelas-tibias | Protarsos | Tarsos | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 3,5 | 5 | 3,2 | 1,3 | 13 mm. |
| II | 3,2 | 4,5 | 2,8 | 1,1 | 11,6 mm. |
| III | 2,5 | 3,2 | 2,2 | 1 | 8,9 mm. |
| IV | 3,5 | 4 | 3 | 1,3 | 11,8 mm. |

Cefalotorax muito estreitado adiante. Olhos posteriores em fila fortemente procurva (uma reta tangente á borda anterior dos médios tangencía a borda posterior dos laterais), os médios menores, separados entre si tres diâmetros e a dois diâmetros dos laterais. Olhos anteriores formando uma linha reta, os médios duas vezes menores. Area dos olhos médios mais alta que larga, mais estreita adiante. Olhos laterais separados um diâmetro, os posteriores maiores. Clípeo mais baixo que a fila dos olhos anteriores. Margem inferior das quelíceras armada de dois dentes muito pequeninos, separados. Peça labial quasi duas vezes mais longa que larga, de ápice arredondado. Fenda traqueal pouco atrás do meio do ventre. Patas I e II com as patelas com um espinho apical; tibias com 2-2-2 espinhos inferiores longos, 1-1 de cada lado e um basilar dorsal; protarsos escopulados até a base, com dois longos espinhos inferiores, um de cada lado e 1-1 dorsais. Abdomen alongado, pontudo atrás.

Cefalotorax, quelíceras, peça labial, lâminas maxilares, ancas e esterno de um amarelo muito pálido (provavelmente verde no vivo). Patas desse mesmo colorido, mas as patas I e II com um ponto negro nos fémures, nas patelas, na base das tibias e na base dos protarsos. Fascículos subungueais negros. Abdomen de ventre testáceo pálido, com o epigino cinzento, e dorso branco, reticulado, com larga faixa mediana testácea e com tres pontos negros, circulares, sendo um maior, na borda anterior, e dois menores, no terço médio.

Localidade tipo: Rio Negro. Tipo: No Museu Nacional, n.º 38170.

*Tasata tigris* sp. n.

♀ — 5 mm.

Cefalotorax baixo, muito estreitado adiante, com longo sulco torácico. Olhos posteriores em fila mui fortemente procurva, semicircular, os médios separados entre si dois diâmetros e a um diâmetro dos laterais. Olhos anteriores equidistantes, em linha reta, os médios duas vezes menores. Area dos olhos médios duas vezes mais longa que larga, muito mais estreita adiante. Quelíceras com dois pequenos dentes na margem inferior do sulco ungueal. Fenda traqueal situada atrás do meio do ventre. Tibias I e II armadas de 2-2-2 espinhos inferiores, 1-1 de cada lado; protarsos com dois inferiores basilares, um de cada lado e um dorsal.

Palpos curtos; patela de comprimento e largura iguais; a tibia pouco maior que a patela e o tarso maior que esses dois segmentos reunidos.

Todo o corpo esbranquiçado, com o seguinte desenho castanho: no cefalotorax um Y mediano, tres pequenas manchas de cada lado e estreita orla lateral; nas patas pequenas manchas na base dos espinhos; no dorso do abdomen numerosas manchinhas esparsas e, na metade posterior, cinco ou seis faixas curvas, transversas, paralelas; nas quelíceras uma faixa longitudinal. Fiandeiras posteriores com a face externa castanha.

Localidade tipo: Rio Negro — Paraná. Tipo: No Museu Nacional, n.º 58269.

———o———

# INDICIOS DA EXISTENCIA DE UM AGENTE ACELULAR CAPAZ DE MALIGNIZAR CELULAS NORMAIS, NO LINFOSARCOMA TRANSPLANTAVEL DO CAMONDONGO

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em trabalho anteriormente publicado ([1]), tivemos ocasião de dizer que devido a uma serie de fatos observados sobre tumores passiveis de transplantação, estes neoplasmas podiam ser considerados como o resultado da malignização de celulas normais, operada graças à atividade de um agente acelular, provavelmente da natureza dos virus filtraveis, o qual existia nas celulas dos inóculos e com elas era transportado para os novos hospedadores do tumor.

Como indicios que servissem de base a esta hipótese, hoje cada vez mais generalizada no dominio da cancerologia, citámos *(a)* as observações já numerosas de adenocarcinomas de camondongos que, após diversos transplantes, eram completamente substituidos por sarcomas; *(b)* a frequencia com que os adenocarcinomas do tubo gastro-intestinal provocam proliferações de aspecto sarcomatoso quando dão metastases nos ovarios; e *(c)* as experiencias interessantissimas com substancias quimicas pelas quais se conseguem tumores malignos sem inoculação de celulas cancerosas.

Essa noção, que a principio parece destituida de maior interesse, tem uma grande significação pratica porque leva a admitir que a formação do tumor não póde ser atribuida apenas a uma causa isolada (celulas embrionarias, parasitos, irritação crónica, ou agente quimico) como até ha pouco se admitia, e sim ao desenvolvimento de um agente da natureza dos virus filtraveis, que encontrarão celulas recem-formadas, nelas passa a se reproduzir, fazendo com que élas deixem de crescer segundo as leis normais do crescimento, para se reproduzirem segundo o modo anómalo que é proprio dos tumores malignos.

O estudo deste assunto nem sempre pode ser feito de uma maneira direta, porquanto, como é sabido, a filtração de extratos de tumores de pequenos animais oferece certo numero de dificuldades. Nesses casos é que intervêm os recursos de outra natureza (centrifugação, tratamento pela glicerina, enxerto e verificação imunologica da especie

(1) MEYER, J. R. e SABORIDO, J. — Novo adenocarcinoma transplantavel do camondongo. — Arch. Inst. Biologico, S. Paulo — v. 7 — pp. 119-124 — 1936.

celular em especie heteróloga etc.) por meio dos quais, ainda que indiretamente, o experimentador póde ou não admitir a existencia de um fator da natureza dos virus filtraveis, como uma das condições necessarias à reprodução e ao aparecimento de um tumor.

No estudo de um tumor do camondongo (2), que vem sendo por nós transplantado ha cerca de doze anos, as tentativas para demonstração de um agente filtravel pelo método direto (filtração) ou pelos métodos indiretos (conservação em glicerina ou simples centrifugação), nunca se seguiram resultados positivos, apezar das experiencias terem sido muito numerosas e feitas sob condições favoraveis. Se bem que diante de tais observações negativas tudo levasse a excluir a existencia de um agente filtravel, com grande constancia eram observados certos fenómenos que depunham em favor da existencia de um fator da natureza dos virus filtraveis, o qual pôde agora ser bem evidenciado, mediante uma tecnica especial.

Tendo presente a ideia de que na maioria dos tumores transplantaveis a atuação e a reprodução de um virus de tumor só se faz quando esse virus encontra celulas recemformadas numa proliferação mais ou menos ativa; sabendo-se que ao se inocularem fragmentos de tumor, os tecidos transportados para o novo hospedeiro atúam, pelo menos em parte, como um corpo extranho, provocando fenomenos inflamatorios com proliferações celulares; tendo-se em vista que, nos tumores resultantes de transplantação, ordinariamente os inóculos aparecem necrosados no centro da massa da tumoral e, considerando-se ainda que o linfosárcoma do camondongo, quando bem desenvolvido, macroscopicamente se apresenta, ao córte, como o resultado da superposição de camadas neoplassicas que crescem não de maneira contínua mas por periodos sucessivos, fomos levados a pensar que o resultado positivo de um enxerto fosse devido não só ao crescimento das celulas enxertadas, mas também á atuação de um agente que élas levavam consigo e que iria instalar-se nas celulas recemformadas durante os fenomenos inflamatórios que decorriam da presença dos fragmentos tumorais introduzidos sob a péle.

Era claro que se essa hipótese representasse a realidade, um fragmento de tumor formado por celulas mortas, mais um produto acelular (da natureza dos virus filtraveis) proprio do tumor, quando enxertados contemporaneamente, realizariam as condições necessárias (presença do agente malignizante e celulas normais em ativa proliferação) para a reprodução do tumor.

(2) MEYER, J. R. — Estudos experimentais acerca de um novo tumor transplantavel do camondongo. — Folia Clinica et Biologica, S. Paulo — v. 1 — pp. 164-175 — 1929.

Para verificar até que ponto essa hipotese podia ser tomada em consideração, realizamos a seguinte experiencia:

Exp. n.º 396 — De um camondongo inoculado tres semanas antes foi extirpado um linfosarcoma tendo aproximadamente o tamanho de uma avelã. Esse tumor foi dividido em duas partes. A primeira metade foi dividida em fragmentos, os quais foram colocados durante 3 minutos num recipiente contendo solução fisiologica em ebulição. A outra metade do tumor foi emulsionada em 5 cc. de solução fisiologica e centrifugada varias vezes sob uma camada de parafina liquida. Após varias centrifugações de cerca de uma hora a uma velocidade de 4.000 rotações por minuto, o liquido resultante foi dividido em duas porções. Uma porção foi deixada em contacto, durante 8 horas e sob uma camada de parafina liquida, com os fragmentos que haviam sido submetidos a fervura, e a outra utilisada para a inoculação de animais testemunhas. Depois de 8 horas os cinco fragmentos fervidos e deixados em contacto com o liquido da centrifugação foram inoculados na região axilar de cinco camondongos normais. Ao mesmo tempo, para nos cercarmos de maior garantia, com a outra parte do liquido de centrifugação foram inoculados cinco camondongos testemunhas (*).

Em seguida à inoculação, e em 3 dias sucessivos, todos os animais (inoculados com os fragmentos e os testemunhas) foram injetados na axila com 0,2 cc. de liquidos centrifugados, de emulsões de outros fragmentos de linfosarcoma conservados em geladeira.

O fim visado com essas inoculações de novas doses de liquido centrifugado era fornecer novas quantidades do agente acelular, quando 1, 2 ou 3 dias após inoculação, os fenomenos proliferativos despertados pelo enxerto eram mais intensos. Dez dias mais tarde, em um dos animais do primeiro grupo (camondongos inoculados com fragmentos fervidos deixados em contacto com o liquido da centrifugação) nota-se, no ponto inoculado, um pequeno nódulo do tamanho de uma pequena ervilha. No segundo grupo (camondongos injetados com o liquido da centrifugação) nada se observa digno de nota.

Um mês depois de serem feitos os enxertos, o animal do primeiro grupo apresenta um nitido linfosarcoma (Exame histopatologico 4.556), ao passo que os animais do segundo grupo nada apresentam. O tumor é extirpado é inoculado em outros camondongos, as suas inoculações continuam "pegando" em 100 % dos enxertos.

Vê-se que a inoculação de celulas mortas deixadas em contacto com material acelular fresco, provindo do tumor, foi capaz de reproduzir o linfosarcoma, ao passo que o simples material acelular fresco, como sóe acontecer quando este é inoculado, mostrou-se incapaz de provocar o aparecimento do linfosarcoma. Como, porém, se poderia pensar que o tumor aparecido no primeiro grupo fosse o resultado da existencia de células tumorais vivas existentes nos inóculos, na seguinte experiencia usámos como testemunhas animais simplesmente inoculados com fragmentos fervidos.

---

(*) Em um número de tentativas anteriores que já atinge a quasi varias centenas de animais mesmo admitindo-se que a centrifugação não fosse feita com os cuidados que a boa técnica deve exigir, verificamos sempre que a simples inoculação do liquido centrifugado e sobrenadante de uma emulsão de linfosarcoma não é capaz de reproduzir o tumor. O mesmo se pode dizer a respeito do material submetido à ebulição.

Exp. n.º 406 — Um linfosarcoma de 12 dias é extirpado e dividido em 2 partes. Uma destas é subdividida em 10 fragmentos que são colocados em solução fisiologica fervente, durante 3 minutos. A outra parte é emulsionada em cerca de 4 cc. de solução fisiologica e varias vezes centrifugada sob camada de parafina liquida. Cinco dos fragmentos fervidos, depois de resfriados são colocados em cerca de 1 cc. do liquido centrifugado e deixados em contacto com êle numa geladeira durante 6 horas. Os outros 5 fragmentos são tambem conservados durante 6 horas sob camada de parafina liquida. Depois de 6 horas todos os fragmentos são inoculados respectivamente em dois lotes de cinco animais que, para maior probabilidade de exito, conforme haviamos verificado anteriormente, tinham sido previamente bloqueados com tinta da China (3).

Durante dois dias sucessivos os animais do primeiro lote recebem no ponto inoculado um total de cerca de 0,2 cc. de liquido de centrifugação, conservado no frio, ao passo que os do segundo recebem no ponto inoculado o mesmo volume de solução fisiologica.

Um mês mais tarde, nos animais do primeiro lote (inoculados com fragmentos fervidos postos em contacto com o liquido de centrifugação) ha dois nitidos linfosarcomas (Exame histopatologico 4.618) localizados nos pontos de inoculação. Os animais do segundo lote (inoculados com fragmentos fervidos tratados apenas pela solução fisiologica) nada apresentam digno de registo.

A experiencia anterior foi repetida em condições identicas tendo fornecido de outra feita um tumor do tipo estudado, como se vê a seguir:

Exp. 461 — Um tumor foi extirpado, dividido em duas metades, as quais são submetidas a ebulição durante 3 minutos. Depois disso cada uma é dividida em 5 pedaços, os quais são inoculados respectivamente em dois grupos de 5 camondongos.

No primeiro grupo, durante um periodo de sete dias, os camondongos recebem 5 injeções no ponto de inoculação, de cerca de 0,5 cc. de um extrato de tumor preparado recentemente com uma emulsão congelada e descongelada varias vezes e depois submetida a uma centrifugação cuidadosa. Os 5 camondongos do 2.º grupo não recebem liquido algum na região inoculada com os pedaços de tumor submetidos a ebulição.

Dentro da 1.ª semana morrem dois camondongos do primeiro grupo.

Ao fim da 3.ª semana após o inicio da experiencia, nos 3 camondongos restantes do primeiro grupo ha um tumor com os caracteres do linfosarcoma, pouco maior que uma avelã, ao passo que entre os animais do segundo grupo nenhum tumor se desenvolveu.

As tres experiencias citadas mostraram, como a anterior, que as celulas mortas tratadas pelo liquido acelular resultante da centrifugação de material fresco, quando inoculadas, dão origem ao linfosarcoma, ao passo que inoculadas sem o tratamento por esse liquido não reproduzem o tumor.

Resumindo os fatos observados, podemos dizer que as celulas de linfosarcoma mortas pelo calor, ou o liquido acelular da centrifugação do material fresco, quando inoculados isoladamente, não provocam o

(3) Meyer, J. R. — Influencia do bloqueio do sistema reticulo-endotelial sobre o desenvolvimento do linfosarcoma transplantavel do camondongo. — Arq. do Inst. Biologico, S. Paulo — v. 3 — pp. 179-180 — 1930.

aparecimento do tumor, e que se esses dois materiais forem inoculados contemporaneamente, são capazes de reproduzir o linfosarcoma.

A mesma tentativa ainda foi repetida com uma pequena variante, na experiencia seguinte:

*Exp.* n.º 438 — Um linfosarcoma é extirpado e dividido em duas partes. A primeira parte é fervida durante 3 minutos em solução fisiologica e subdividida em 5 pedaços iguais. Cada um destes pedaços é inoculado em um camondongo. A segunda parte é emulsionada em cerca de 4 cc. de solução fisiologica e centrifugada durante meia hora em duas fases sob uma velocidade de cerca de 4.000 rotações por minuto. O liquido sobrenadante centrifugado é colhido cuidadosamente e injetado não só no ponto de inoculação dos 5 camondongos que receberam tumor fervido, como em 5 camondongos testemunhas que não receberam fragmentos de tumor.

Durante a primeira semana que se seguiu à experiencia todos os animais recebem novas doses de centrifugado obtido de tumores recem-extirpados, conforme ficou indicado.

Um mês e dez dias depois da experiencia, no grupo dos animais que receberam tumor fervido mais centrifugado, ha um tumor nitido. No grupo dos animais que só receberam centrifugado nenhum tumor se desenvolveu.

O tumor obtido (Exame histo-patologico n.º 4.793) tem histologicamente os caracteres tipicos do linfosarcoma.

Trez outras experiencias feitas em condições identicas não apresentaram resultados dignos de registo.

Dos fatos observados ha, pois, indicios muito evidentes de que a hipotese formulada está de acordo com a realidade, *podendo o aparecimento do tumor nos animais inoculados ser causado pela malignização das celulas recemformadas durante a reação inflamatoria provocada pelo enxerto, e isto devido a um agente do tipo dos virus filtraveis.*

Em uma tentativa feita para se reproduzir o linfosarcoma, injetando-se uma suspensão de areia de infusorios (capaz de provocar fenomenos inflamatorios com proliferação celular) em material centrifugado, o tumor não se reproduziu.

Sem pretender ter encontrado a melhor explicação para este ultimo fato, acreditamos que, não obstante muitas substancias serem capazes de provocar a adsorção do agente acelular da natureza dos virus filtraveis, o tumor fervido é material mais proprio do que a areia de infusorios para a reprodução do tumor, porquanto este ultimo oferece um meio quimico mais adequado a abrigar o agente tumorigeno quando o liquido de centrifugação é posto em contacto com êle.

Os estudos feitos sobre o assunto estão sendo continuados no sentido de se verificar se as celulas tumorais tratadas durante meses pelo frio são capazes de se comportarem como as celulas submetidas a

fervura, e no sentido de averiguar se celulas normais de órgãos de camondongos sem tumor, quando enxertadas com o liquido acelular do linfosarcoma, também podem reproduzir a neoplasia.

Conquanto os estudos referidos neste trabalho ainda estejam em inicio, os resultados positivos são interessantes porque estão de acordo com as observações de um grande numero de autores, tornando explicaveis numerosos fátos que pareciam contraditorios. Assim, por exemplo, a ideia de que a reprodução de um tumor depende de um virus que precise, para seu desenvolvimento, de celulas recemproliferadas, está de acordo com a teoria de B. FISCHER WASELS, para quem o momento importante no aparecimento do tumor é o da existencia de celulas em multiplicação ativa.

Está ainda de acordo com a teoria de VIRCHOW, que vê nas irritações crónicas (que como é sabido são acompanhadas de proliferações celulares) o momento predisponente para o aparecimento dos neoplasmas, e está de acordo tambem com as experiencias modernas pelas quais se demonstra a existencia de um agente acelular (virus filtravel) em grande numero de tumores transplantaveis.

Outra ilação interessante que póde ser tirada das considerações feitas é a hipotese de que na natureza, como acontece com outros sêres causadores de doença, possam existir muitos agentes do tipo dos virus filtraveis, só demonstraveis pelos efeitos nocivos que causam, os quais, em estado mais ou menos saprofitario e, porisso mesmo, imperceptiveis, existem espalhados pelo organismo, só se revelando na ocasião em que, mediante circunstancias proprias, adquirem propriedades patogenicas vindo a figurar como um dos dois componentes que tomam parte na patogenia dos tumores malignos.

## EVIDENCES OF A NON CELLULAR AGENT IN THE LYMPHOSARCOMA OF THE MOUS CONFERRING MALIGNANT PROPERTIES TO NORMAL CELLS

*Abstract*

*This paper refers to experiments showing the possibility of reproducing a transplantable lymphosarcoma (previously decribed), by means of a non cellular fluid obtained by centrifugation of an emulsion of the tumour tissue, when inoculated in association with pieces of dead tumour tissue. Control animals inoculated separately with one of parts used in each experiment failed to develop the tumour.*

o———

# NOVO TIPO DE RECIPIENTE PARA MONTAGEM DE PEÇAS DE MUSEU

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 42-45

A dificuldade encontrada no comercio para a obtenção de frascos de vidro destinados a montagem de peças anatomo-patologicas e a que se encontra na pratica para manter perfeitamente fechados os recipientes comuns de museu, quando cheios de liquidos fixadores, motivou a creação de um tipo especial de frascos capaz de evitar esses inconvenientes.

O tipo ideado é uma modificação dos chamados "vidros de relogio". Como é sabido, quando se monta uma peça nesses recipientes, o enchimento deles com os liquidos de conservação tem que ser feito antes da soldadura das duas partes que formam a camara de contensão das peças. Essa soldadura é uma das manobras mais dificeis de se conseguir porque exige superficies perfeitamente planas e muito secas, ou sejam duas condições que nem sempre se conseguem. Porisso mesmo é que, quando a montagem está feita, depois de terminada a soldadura das duas partes que formam o recipiente e se supõe que este vae ficar sem bolhas no interior, em consequencia das mudanças de temperatura se verifica, em grande numero de preparados, a penetração de ar dentro dos recipientes, o que indica que o fechamento não foi perfeito. Como a superficie que fórma a borda do "vidro de relogio" que deve ficar em contáto com o vidro plano é muito reduzida, e como o enchimento desses recipientes tem que ser feito antes da soldadura dessas duas partes, o que muito dificulta o processo, removemos essas dificuldades adotando um metodo original em que o "vidro de relogio" tem na periferia uma parte plana que permite maior contáto e, proximo a essa margem, um pequeno orificio que torna possivel a introdução do liquido fixador no recipiente, depois de obtida a soldadura das duas partes que o formam.

Das duas partes em questão, a primeira é formada por uma peça de vidro concava (Estampa 42, fig. *A*). Sua fórma é a de uma calota esferica com um rebordo plano, tendo esmerilhada a superficie de contáto. Proximo da perifería ha um orificio para introdução do liquido, o qual fica a 1 cm. do rebordo concavo e tem aproximadamente 2 mms. de diametro. A outra parte é formada por uma placa quadran-

gular de vidro plano, de grossura dupla ou tripla. Pela adatação dessas duas porções forma-se uma camara tendo a fórma de uma lente plano-convexa.

O processo de montagem das peças nesses recipientes compreende as seguintes manobras:

1.º) Marcar com um traço de lapis dermografico, com tinta ou com diamante (Estampa 42, fig. *B*) a posição exáta em que deve ficar a peça concava sobre a peça plana.

2.º) Contenção da peça a montar no recipiente. Quando se pode cortar ou obter uma peça que tenha uma espessura um pouco maior (2-3 mms.) que a profundidade do recipiente, a contenção se consegue pela simples pressão. Quando a grossura da peça é muito menor, sua contenção se faz prendendo-se a uma barra de vidro igual ao diametro do recipiente ou a um circulo de celuloide transparente que possa ser colocado dentro da camara.

3.º) Acertada a posição da peça dentro do vidro concavo, enxuga-se perfeitamente a superficie esmerilhada e aplica-se sobre ela o material escolhido para a soldadura das duas partes de vidro (Est. 43, Fig. *C*).

4.º) Depois de bem distribuida a substancia adesiva adotada para a soldadura, acerta-se a placa de vidro plano sobre a parte esmerilhada do vidro concavo de modo a formar a camara contendo a peça em seu interior (Est. 43, Fig. *D* e Est. 44, Fig. *E*). O traço feito sobre o vidro plano durante a primeira manobra indicará a posição exáta em que deve ser feita a soldadura.

5.º) A manobra final consiste em encher o recipiente formado, com o liquido escolhido como fixador definitivo, e em fechar o orificio (Est. 44, Fig. *F*). Essa operação se faz introduzindo no orificio uma agulha de injeções posta, por um tubo de borracha, em comunicação com uma seringa, funil ou reservatorio contendo o fixador definitivo (Est. 45, Fig. *G*). O fechamento se faz por meio de uma pequena arruela de borracha presa ao orificio com parafuso e rosca (Est. 45, Fig. *H*).

6.º) Nos logares muito quentes, quando se usa como adesivo uma substancia sensivel ao calor, é de vantagem garantir a posição do vidro concavo sobre o plano, com quatro calços pequenos.

O processo descrito é um metodo relativamente simples e que, além de não exigir os classicos recipientes retangulares, de obtenção dificil, tem diversas vantagens. Uma delas é a de ser mais economico, porquanto não exige, para a conservação definitiva, uma quantidade

tão grande de liquido fixador. Este detalhe tem grande importancia no caso de orgãos ou peças de origem animal, fixados com acetato de potassio ou com cloral, dado o preço elevado dessas drogas. A fórma das preparações definitivas tambem é mais conveniente. O seu tamanho e o seu peso tambem são muito menores. Disso resulta que o espaço requerido para a coleção do museu ou arquivo das peças é muito mais reduzido e muito mais comodo o seu manejo durante as demonstrações.

Os recipientes descritos tambem permitem uma substituição muito facil dos liquidos conservadores quando estes se tornem turvos ou carregados de pigmentos.

Um detalhe que tambem é digno de registro consiste em o recipiente agir como uma lente de certo aumento quando está cheio de liquido, tornando assim mais visiveis alguns detalhes das peças nele contidas.

———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 42

Fig. *A* — As duas partes de vidro que devem formar a camara contensora das peças: um vidro concavo com margem plana e uma placa de vidro plano.

Fig. *B* — Para que seja perfeita a adatação das peças de vidro, deve-se marcar sobre o vidro plano e com um traço de diamante ou de lapis dermografico, a posição exáta que o vidro concavo deve ocupar sobre ele.

### Estampa 43

Fig. *C* — Colocação da substancia adesiva sobre a superficie esmerilhada da margem do vidro concavo. Quando essa substancia é resinosa a operação deve ser feita a quente.

Fig. *D* — Colocação da peça na posição em que deve ficar dentro da camara.

### Estampa 44

Fig. *E* — Quando a substancia adesiva é resinosa seca-se e aquece-se a placa de vidro plano na porção que deve ficar em contáto com a margem do vidro concavo, antes da soldadura das duas partes.

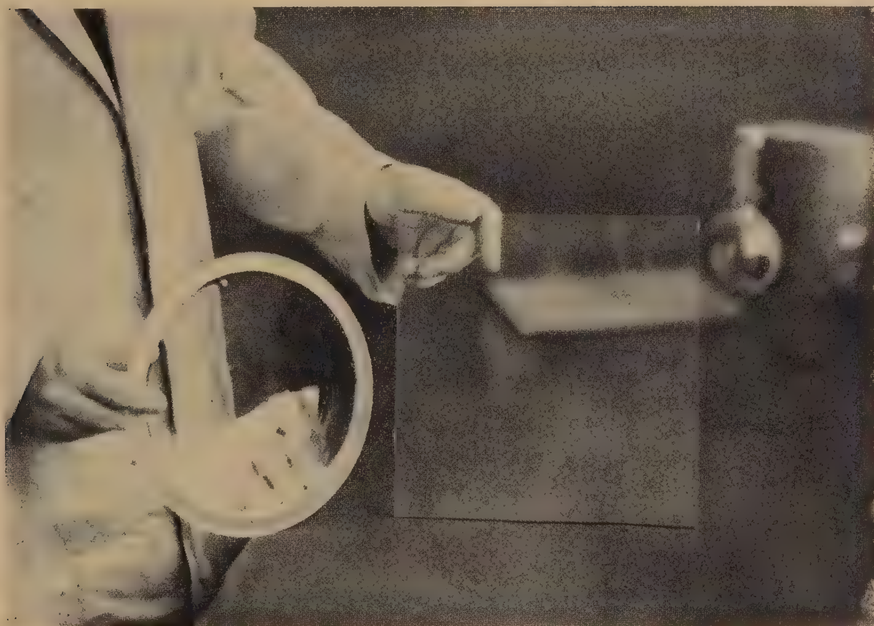
Fig. *F* — Adatação e soldadura da placa de vidro plano sobre o vidro concavo, para formar a camara, tendo a peça em seu interior.

### Estampa 45

Fig. *G* — Enchimento da camara contendo a peça, com o liquido fixador definitivo.

Fig. *H* — O orificio do vidro concavo deve ser fechado após o enchimento da camara com o fixador definitivo.

———o———



*A*



*B*



*C*



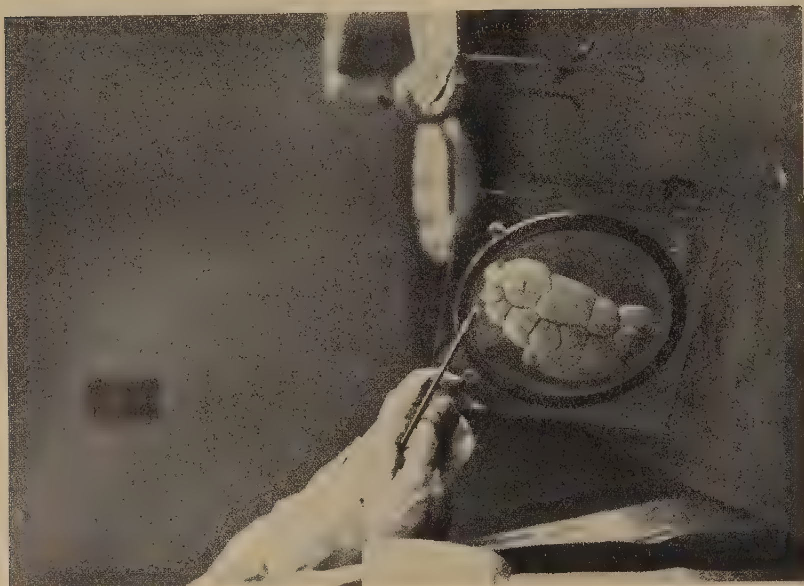
*D*



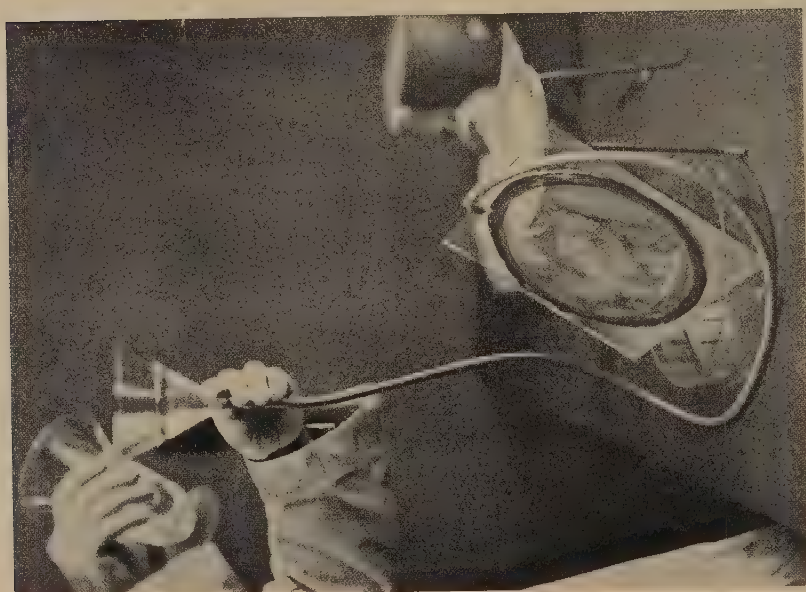
*E*



*F*



H



G

# ESTRUTURA QUIMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

POR

Quintino Mingoja

Do Laboratorio Paulista de Biologia, S. Paulo

Depois que G. DOMAGK evidenciou as propriedades antiestreptococicas do Prontosil ou p. sulfamidacrisoidina, no transcorrer de pouco mais de 5 anos a literatura cientifica enriqueceu-se de milhares de publicações, obra de quimicos, farmacologistas e de clinicos. Os primeiros prodigalizaram-se em preparar derivados cada vez mais novos e variados afim de submete-los á experimentação biologica; os farmacologistas ocuparam-se em avaliar os novos medicamentos quimioterapicos antibacterianos e em esclarecer o mecanismo de sua ação; os clinicos dedicaram-se a experimentar contra doenças diferentes — nem sempre de origem bacteriana — os novos medicamentos que lhes apresentaram os diversos laboratorios quimicos. Sob todos os ceus a quimioterapia antibacteriana suscitou ondas de entusiasmo, muitas vezes plenamente justificado; doenças, no passado temiveis e perigosas, cederam rapidamente ante essa nova arma, essencialmente quimica; milhares e milhares de vidas foram arrancadas a uma morte certa e tormentosa; as armas insidiosas de Atropos foram neutralizadas pelas novas "bolinhas magicas", no dizer de EHRLICH, da quimioterapia. E, como nos tempos de EHRLICH se falava de uma era dos arsenobenzois, assim hoje se fala da era dos sulfamidicos; porém, se é exato o primeiro termo, não o é o segundo, pelo menos para nós, os quimicos.

Quem teve a paciencia de ler os trabalhos, experimentais ou compilativos, sobre quimioterapia antibacteriana, que desde 4 anos publico no Brasil, terá notado que desde algum tempo substitui definitivamente o termo *terapeutica sulfamidica* por *terapeutica sulfanilamidica*. E eis por que.

E' sabido que, de inicio, a atividade quimioterapica do Prontosil foi atribuida ao azogrupo presente em muitos outros compostos dotados de ação tripanomicida. Mas em Novembro 1935, J. e J. TRÉFOUEL, F. NITTI e D. BOVET (106) observaram as propriedades curativas antiestreptococicas da p. aminofenilsulfamida, composto empregado para a sintese do Prontosil; e em Maio de 1936 o afamado quimico francez E. FOURNEAU, junto com os seus referidos colaboradores (29), depois de experimentar cerca de 130 compostos quimicos,

semelhantes ou não ao Prontosil, demonstrou que a parte ativa da sulfamidacrisoidina é constituida pelo nucleo para-aminofenilsulfamidico, e que todos os medicamentos antiestreptococicos, até então conhecidos, somente agem devido á p. aminofenilsulfamida. Este produto já tinha sido preparado por GELMO em 1908 (33) ; segundo o sistema de enumeração já aplicado pelos discipulos de EHRLICH aos arsenobenzois, os francezes chamaram-o *1162 Fourneau*. Responsavel pela ação antiestreptococica, foi por isso designada a função sulfamidica — $SO_2NH_2$ e não mais o azogrupo — N:N—.

FOURNEAU e colaboradores conseguiram fixar algumas regras fundamentais sobre as relações existentes entre estrutura quimica e atividade antibacteriana. Essas regras, resumidas mais tarde pelos colaboradores de FOURNEAU (107), podem ser esquematizadas da maneira seguinte:

1.º) Das tres aminofenilsulfamidas, unicamente a "para" é quimioterapicamente ativa. Isto demonstra pois que não basta a presença do radical — $SO_2NH_2$ para que se evidencie a atividade antibacteriana; faz-se necessaria tambem a presença do esqueleto do acido sulfanilico. A atividade é dada não pelo radical sulfamidico, e sim pelo esqueleto sulfanilamidico; portanto, quimicamente falando, é mais exato referir-se á terapeutica sulfanilamidica do que á terapeutica sulfamidica.

2.º) A importancia do esqueleto sulfanilamidico para que um produto apresente atividade antibacteriana é confirmada pelo fato de desaparecerem as propriedades quimioterapicas, seja quando se substitue o —$SO_2NH_2$ ou o —$NH_2$ por outros substituintes, seja quando se introduz no nucleo aromatico um terceiro grupo funcional.

3.º) No que se refere á substituição, parcial ou total, do hidrogenio dos grupos —$NH_2$ e —$SO_2NH_2$, os AA. francezes afirmaram que: a) substituindo o H do radical —$SO_2NH_2$ por alquilas ou arilas, as propriedades permanecem só nos termos metilado e etilado; acetilando contemporaneamente o grupo —$NH_2$ livre, a atividade antiestreptococica diminue, mesmo nos derivados metilado e etilado; b) substituindo o H do grupo —$NH_2$ por diferentes radicais acidos, as propriedades antiestreptococicas diminuem ou desaparecem; a atividade pode permanecer, ás vezes, substituindo o H aminico por alquilas ou arilas, como no caso do derivado benzilico.

4.º) Nos compostos corantes, tipo crisoidina, visto que a atividade é dada pelo esqueleto sulfanilamidico, não influe a natureza quimica da parte da molecula usada como copulante.

*
* *

Estes principios fundamentais sobre as relações existentes entre estrutura quimica e atividade antibacteriana, sofreram pouco a pouco alterações, mais ou menos profundas.

Primeiramente, já em 1937, BUTTLE e colab. (5) mostraram que a atividade antibacteriana não é prerrogativa só dos compostos contendo o radical — $SO_2NH_2$; de fato, a diamino—4,4' difenilsulfona:




e o dinitroderivado correspondente são extremamente ativos nas infecções estreptococicas experimentais do camondongo. Contemporaneamente, na França, FOURNEAU e colab. (30) constatavam que, além da dinitrodifenilsulfona, outros tiocompostos, como o dinitro—4,4' difenilsulfureto e o dinitro—4,4' difenildisulfureto, correspondentes respectivamente ás formulas:







apresentam notaveis propriedades antiestreptococicas.

Outro sulfureto ensaiado com exito por GLEY e GIRARD (35) foi a tioanilina ou diamino—4,4' difenilsulfureto; o mesmo GLEY (36) encontrou atividade antiestreptococica em outros dois tiocompostos, isto é o acido p. acetilaminobenzensulfinico e o p. acetilaminotiofenol, correspondentes, respectivamente, ás formulas seguintes:







De outro lado GIRARD (34) experimentou varios sulfoxidos, quimioterapicamente ativos; entre eles o nitro—4 amino—4' difenilsulfoxido




mostrou-se particularmente ativo na toxinfecção experimental gonococica.

A todos esses tiocompostos desprovidos do radical —$SO_2NH_2$ e que se demonstraram ativos nas infecções experimentais bacterianas, tive já ocasião de referir-me em precedente trabalho (76); acho pois superfluo insistir; lembro somente que, apezar de distinguidos por novos nomes ou siglas, todos esses compostos eram quimicamente conhecidos ha alguns decenios. Nenhum deles entrou porém no uso clinico; uma aparição fugaz foi feita só pela diacetilaminodifenilsulfona, caraterizada mediante a sigla *1399 F* e posta por pouco tempo em comercio pela RHÔNE-POULENC com o nome de *Rodilone*.

Se observarmos, do ponto de vista estrutural, as formulas de todos os citados compostos, sulfamidicos ou não, achamos sempre o seguinte esqueleto fundamental:



Eis por que, baseado nos fatos acima citados, ha tempo afirmei (77) que condição necessaria mas não suficiente para que um composto apresentasse atividade antibacteriana é a presença do esqueleto fundamental citado. O enxofre pode encontrar-se sob forma de radical —$SO_2NH_2$, mas esta funcionalidade não é indispensavel.

Na realidade, tambem este conceito foi sucessivamente infirmado. De fato, nas infecções experimentais, ás vezes estreptococicas, ás vezes pneumococicas, ás vezes gonococicas mostraram notavel atividade varios compostos, quer não sulfurados, quer não azotados. Recordo a proposito:

1) o 110 Girard ou dioxi—4,4' difenilsulfona, experimentado por LEVADITI e colab. (62) e ativo nas meningococias;

2) a hidroquinona, a diacetilhidroquinona, o dioxiazobenzol, o p. aminofenol e o diaminoazobenzol, tambem estudados por LEVADITI e colab. (63);

3) o acido nitro-4 acetilamino-4' difenilarsinico, ensaiado com exito nas infecções experimentais estreptococicas por ROSENTHAL e colab. (92);

4) o acido p. nitrobenzoico e varios dos seus esteres, ativos nas infecções experimentais estrepto e pneumococicas do camondongo, segundo MAYER e OECHSLIN (69);

5) o acido p. sulfamidafenilarsinico (86) e o analogo acido stibinico (46) (50), obtidos aplicando á sulfanilamida a conhecida reação de BART.

Fato notavel: todos estes derivados são compostos para-bisubstituidos, assim como o é a sulfanilamida. Esses compostos porém não foram até agora utilizados na clinica; eis por que as pesquizas dos quimicos continuaram fundamentalmente no caminho inicial, isto é ao encontro de preparações de derivados sulfanilamidicos mais ativos e menos toxicos que a substancia mãe e contendo sempre o conhecido esqueleto fundamental. Outras pesquizas foram efetuadas com o intuito de corrigir algumas caracteristicas fisico-quimicas da sulfanilamida pouco convenientes do ponto de vista farmacoterapico (como, por ex. a escassa solubilidade em agua). Vejamos de perto ambos esses grupos de pesquizas.

DERIVADOS N-SUBSTITUIDOS DA SULFANILAMIDA — Como é sabido, podendo os grupos substituintes ser ligados ao N aminico ou ao amidico, por convenção internacional designam-se com $N^4$ os derivados substituidos no grupo —$NH_2$ e com $N^1$ os substituidos no radical —$SO_2NH$ . Podemos pois dividir os derivados N-substituidos da sulfanilamida em tres subgrupos, a saber: $N^4$-monosubstituidos, $N^1$-monosubstituidos e $N^1N^4$-disubstituidos.

DERIVADOS $N^4$-SUBSTITUIDOS. — Já recordei que, segundo as observações de FOURNEAU e colab., introduzindo em posição $N^4$ radicais acidos, as propriedades antibacterianas diminuem ou desaparecem, enquanto a atividade quimioterapica pode permanecer com a introdução de alquilas ou arilas.

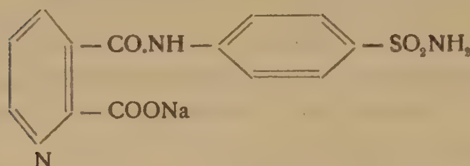
Ulteriores pesquizas demonstraram que tal regra não se verifica constantemente; de fato, por ex., MILLER e colab. (75), comparando a atividade de numerosas $N^4$-acilsulfanilamidas, obtiveram os resultados transcritos no seguinte quadro:

| Sulfanilamida | Acila | Atividade |
|---|---|---|
| Sulfanilamida . . | — | +++ |
| Acetil — . . . . | $CH_3.CO$ — | + |
| Propionil — . . | $C_2H_5.CO$ — | ++ |
| Butiril — . . . | $C_3H_7$ — CO — | ++ |
| Isobutiril — . . | i — $C_3H_7.CO$ — | + |
| Valeril — . . . | $C_4H_9.CO$ — | +++ |
| Isovaleril — . . | i — $C_4H_9.CO$ — | + |
| Caproil — . . . | $C_5H_{11}.CO$ — | +++ |
| Isocaproil — . . | i — $C_5H_{11}.CO$ — | O |
| Eptoil — . . . | $C_6H_{13}.CO$ — | ++ |
| Octoil — . . . | $C_7H_{15}.CO$ — | + |
| Lauril — . . . . | $C_{11}H_{23}.CO$ — | O |
| Maleil — . . . | HOOC.CH:CH.CO — | + |
| Sucinil . . . . | HOOC.$(CH_2)_2$.CO — | + |
| Benzoil . . . . | $C_6H_5CO$ — | O |

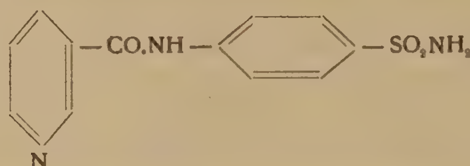
Os AA. concluem: "*The results of our tests indicate that the monocarboxylic acid derivatives are more effective than the dicarboxylic acid derivatives. This activity appears to increase with the increase in length of the acylgroup up to and includings six carbon atoms, after witch it falls off rapidly. The normal acyl-derivative are more active than the corresponding iso compounds. The aromatic group ($C_6H_5CO$-) appears to be less active than the straight chain acyl group ($C_6H_{13}CO$-) or the benzyl group ($C_6H_5CH_2$-).*"

Todavia, tambem estas deduções não fogem a criticas. De fato, o sucinilderivado, preparado por J. ROSICKY (93) e patenteando no comercio sob diferentes nomes (*Anaseptil, Derganil*, etc.) seria, segundo alguns, mais ativo do que acreditam os AA. americanos; e tambem o $N^4$-oleilderivado, no qual portanto a acila tem 18 atomos de carbono, foi patenteado pela I. G. Farbenindustrie (47).

Parece outrossim que, ligando em $N^4$ um acido com nucleo heterociclico, obtêm-se derivados ativos e pouco toxicos; lembro a proposito o *Supron*, com a formula:

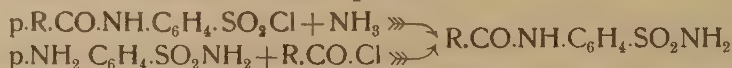



e que, preparado por J. ROSICKY (94), foi experimentado com sucesso na seticemia experimental estreptococica por HYKES e RERABEK (44). Mais recentemente, isto é em Abril de 1940, DANIELS e IWAMOTO (17) prepararam a $N^4$-nicotinilsulfanilamida, com a formula:




Este derivado, cuja sintese completa, já reproduzi aqui, parece ser, nas estreptococias e nas pneumococias, tão ativo quanto a sulfapiridina, sendo mesmo assás menos toxico.

Além dos termos acima citados, numerosissimos $N^4$-acilderivados da sulfanilamida foram descritos e patenteados em todo o mundo. Geralmente, são preparados, ou fazendo agir os cloretos acidos sobre a sulfanilamida em dissolvente inerte, em presença ou não de piridina, ou condensando os cloretos de 4-acilaminobenzosulfonila com amoniaco ou carbonato de amonio. Tem-se portanto:



$$\left.\begin{array}{l} p.R.CO.NH.C_6H_4.SO_2Cl + NH_3 \\ p.NH_2\,C_6H_4.SO_2NH_2 + R.CO.Cl \end{array}\right\} \rightarrow R.CO.NH.C_6H_4.SO_2NH_2$$

Além de radicaes acidos simples, foram ligados em $N^4$ residuos de oxiacidos (21) (48) (53), aldo- e ceto-acidos (85), acidos alogenados (84) (85), aminoacidos (70) (101), acidos carbamicos (23) (102), etc. Compostos da formula geral $XNH.CO.NH.Ar.SO_2NH_2$, na qual $X{=}H$ ou $CH_3CO$- e Ar=fenila ou tolila, foram preparados recentemente por COX (13), porém mostraram-se inativos.

Além de varias anilidas (39) (41) (57), foram descritos novos produtos de copulação da diazosulfanilamida com timol e cloro-m-xilenol (103).

De outro lado, não menos numerosos são os $N^4$-alquil ou arilderivados da sulfanilamida, até agora preparados. Um dos primeiros termos entrado na pratica clinica foi a *Septazine* ou $N^4$-benzilsulfanilamida, patenteada pela RHONE-POULENC (90) e preparada mediante redução da base de Schiff proveniente da condensação da sulfanilamida com benzaldeido. Derivados analogos foram sucessivamente

patenteados pela mesma RHONE-POULENC (91), pela HOFFMANN-LA ROCHE (40), etc.

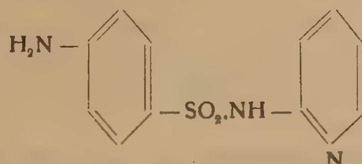
DERIVADOS N¹-SUBSTITUIDOS — Segundo as primeiras observações de FOURNEAU e colab., substituindo o hidrogenio sulfamidico por alquilas ou arilas, a atividade antibacteriana deveria diminuir. Ao contrario, viu-se que introduzindo em N¹ determinados radicais acidos ou nucleos ciclicos ou heterociclicos, obtêm-se derivados que apresentam atividade quimioterapica particularmente importante não somente nas estreptococias comuns, mas tambem e mais especialmente nas pneumococias, gonococias, etc.

Os primeiros N¹-derivados utilizados na clinica foram os do tipo *Diseptal* e correspondentes á formula geral:




Como é sabido, o termo mais conhecido é o *Uliron*, estudado pelo mesmo DOMAGK nos laboratorios da I. G. FARBENINDUSTRIE. Varios outros derivados analogos foram preparados por experimentadores diferentes, como CROSSLEY e colab. (14), WIENIEWICZ (26), a N. V. ORGACHEMIA (87), a CALCO CHEMICAL (7), etc. Pode-se dizer que estes termos estão para a sulfanilamida assim como os polipeptides estão para os aminoacidos.

De particular interesse mostraram-se tambem os derivados contendo, em posição N¹, nucleos heterociclicos penta- ou hexa-atomicos; o mais conhecido neste grupo é a sulfapiridina, obtida pela primeira vez nos laboratorios da firma MAY e BAKER em Dagenham (67) e por isso chamada *Dagenan:*



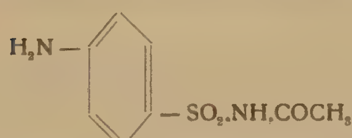

Ao contrario da sulfapiridina, os derivados analogos com nucleos quinoleico e isoquinoleico, estudados respectivamente por CHOUDHURY e colab. (12) e por BOBRANSKI (4), não se demonstraram ativos.

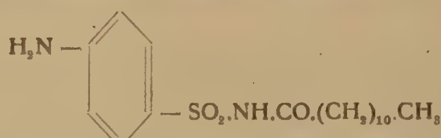
Sobre a sintese da sulfapiridina, por mim reproduzida no Brasil desde 1938 (78), foram publicados diversos trabalhos por GOLDYREV e POTOVSKY (37), WINTERBOTTOM (110), CROSSLEY e colab. (16), GRAY (38). Em colaboração com M. ROCHA E SILVA estudei recentemente (80) o comportamento sorologico de varias azoproteinas sulfanilamidicas, entre as quais a preparada mediante a sulfapiridina.

Os derivados com nucleo tiazolico foram descritos por FOSBINDER e WALTER (28) e, mais recentemente, por LOTT e BERGEIM (65); em Março deste ano foi publicado o relatorio preliminar do *Council on pharmacy and chemistry* (45).

Outros numerosos $N^1$-derivados não acilicos foram obtidos condensando o cloreto do acido acetilsulfanilico com compostos aminicos varios, muitas vezes com função mixta: aminoalcoois (1) (100), aminocetonas (71), diaminas (52) (68), aminoacidos (8) (49) (51). Empregando a dietilamino-1 amino-4 pentana e aminas similares, DROSDOW e STAWROSKAJA (20) tentaram a preparação de derivados ativos contra a malaria.

Entre os derivados $N^1$-substituidos acilicos, recordam-se em modo particular a $N^1$-acetilsulfanilamida ou *Albucid* SCHERING e a $N^1$-dodecanoilsulfanilamida, tendo, respectivamente, as formulas:



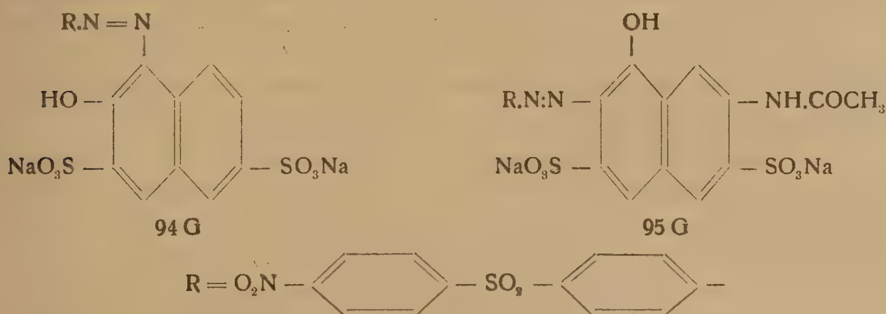




O primeiro foi indicado como antibacteriano polivalente e menos toxico que a sulfanilamida, o segundo demonstrou-se particularmente ativo nas infecções experimentais do camondongo por estreptococo beta-hemolitico e ainda mais na tuberculose experimental das cobaias. A preparação dos citados compostos e de outros homologos foi tomada em consideração recentemente por CROSSLEY e colaboradores (15).

DERIVADOS $N^1N^4$-DISUBSTITUIDOS — A introdução contemporanea de substituintes em $N^1$ e em $N^4$ não reforça a atividade antibacteriana. Entre os numerosos termos preparados recentemente recordo os $N^1N^4$-diacilderivados descritos por CROSSLEY e colab. (15), os compostos dinicotinicos e acetilnicotinicos preparados por DANIELS e IWAMOTO (17), os termos da serie $ArCH{:}N.C_6H_4SO_2NHR$, obtidos por KOLLOFF e HUNTER (58), aqueles do tipo $Ac.C_6H_4SO_2NH.CH_2CHO.R$, terapeuticamente inativos e descritos por ADAMS e colab. (2), os de tipo mixto patenteados pela SCHERING-KAHLBAUM (96) ou descritos por DROSDOW e STAWROSKAJA (19), etc.

DERIVADOS SULFONICOS — No campo dos derivados sulfonicos as pesquizas quimicas foram bem menos numerosas que no campo da sulfanilamida. Varios termos, velhos e novos, foram tomados em exame por RAIZISS e colab. (89), por BUTTLE e colab. (6). Produtos de condensação do 1358 Fourneau com aldeidos e seus derivados hidrogenados foram patenteados pela I. G. FARBENINDUSTRIE (55), pela WELLCOME FOUNDATION (108), pela SCHERING (97), enquanto a

HOFFMANN-LA ROCHE patenteou a amino-4 sulfonamido-4' difenilsulfona (42). LEVADITI e colab. (64) experimentaram com sucesso nas estrepto- e gonococias o 94 e o 95 Girard, derivantes da copulação da nitro-4 amino-4' difenilsulfona com acidos naftoicos e correspondentes ás formulas:




Todos estes N-derivados das sulfonas são menos toxicos que as substancias mães.

DERIVADOS HIDROSOLUVEIS DA SULFANILAMIDA — Paralelamente á preparação de derivados N-mono ou bisubstituidos, foram preparados diversos sais da sulfanilamida, assás mais soluveis em agua que a substancia mãe. Os citados sais são preparados mui simplesmente, tratando a sulfanilamida com a quantidade estequiometrica dos acidos; esses são, em certo sentido, comparaveis aos sais alcaloideos, isto é produtos de adição e não de substituição. Com tal escopo foram utilizados os acidos mandelico (82), canforico (27) (82), canfosulfonico (24) (25), salicilico (112), fenolsulfonico (25) (27), fenilquinolincarbonico (82), etc. Foram tambem preparados sais metalicos da formula geral $NH_2C_6H_4SO_2NHMe$, em que Me=metal monovalente (83). Da $N^4$-allilsulfanilamida foi experimentado tambem o sal de ouro na tuberculose (32).

Como veículos para preparar soluções concentradas de sulfanilamida, além dos glicois comuns sobre os quais tive já ocasião de escrever (79), foi preconizado o alcool veratrilico (43).

Para aumentar a solubilidade da sulfanilamida em agua foi sugerido o emprego de diversas substancias: a urotropina (95), a dietilamina (72), os sais de quinina (9) (10) (22), o formaldeidosulfoxilato de sodio, só (3) (11) ou com etilenoglicol (104) e, especialmente, varios aldosos (60) (73) (85) (98) (111). A. LANNUNG (61) aconselha uma mistura de glicose e de fosfato monosodico. Realmente, no que diz respeito á rongalita e aos aldosos, pode-se pensar que haja uma condensação com formação das bases de Schiff correspondentes.

Para ultimar a resenha bibliografica quimica, lembro por fim os metodos de purificação indicados pela I. G. (54) para a sulfanilomida e por PENCE e WINTER (88) para o cloreto de acetilsulfanila. GALLO e BALDINI (31) estudaram a analise termica do sistema sulfanilamida-timol; KERMACK e colab. (56) transformaram a sulfanilamida no correspondente derivado oxidrilado, mediante diazotação, e depois nitraram-no em posição 3.Reações analiticas e ensaios fisico-quimicos foram efetuados por SCUDI (99), TOWNE e HITCHENS (105), MAC LACHLAN (66), etc.

No que se refere á dosagem da sulfanilamida nos liquidos biologicos, são dignos de menção os recentes trabalhos de WERNER (109), que utiliza o dimetilaminobenzaldeido, de KREBS e FRAKE (59), de DOBLE e GEIGER (18), que usam como copulante a difenilamina. Para os comprimidos, MIKÓ (74) emprega o beta-naftol; em trabalho no prelo (81) observei que, como copulante, em lugar da dimetil-alfa-naftilamina, geralmente empregada, pode ser muito bem utilizado o tiocol, produto de menor custo e que se encontra com mais facilidade.

## CONCLUSÕES

Depois desta rapida resenha das pesquizas quimicas efetuadas no campo dos medicamentos sulfanilamidicos, quais as conclusões que podemos tirar quanto ás relações existentes entre estrutura quimica e atividade antibacteriana?

Integrando, baseado nos novos conhecimentos, os principios enunciados por FOURNEAU e colaboradores em 1936, pode-se concluir que:

1.º) Condição necessaria, mas não suficiente, para que um produto apresente atividade quimioterapica antibacteriana é a presença, na sua molecula, do esqueleto fundamental p.=N-$C_6H_4$-S-. Outros compostos, sem o citado esqueleto, mas sempre para-disubstituitos, mostraram-se ativos contra algumas infecções experimentais bacterianas; nenhum deles foi porém clinicamente utilizado.

2.º) Entre todos os compostos ativos e providos do citado esqueleto fundamental, mostraram-se mais indicados para o uso clinico os dotados de radical sulfamidico e portanto derivados da sulfanilamida.

3.º) Introduzindo na molecula da sulfanilamida grupos substituintes em $N^1$ ou em $N^4$ ou em $N^1N^4$, a atividade quimioterapica vem ou atenuada ou anulada ou orientada para particulares infecções bacterianas. Tais modificações dependem não só da natureza do grupo substituinte, mas tambem da posição na qual tal grupo vem introduzido;

assim, por exemplo, introduzindo o radical $CH_3CO$- na posição $N^4$ da sulfanilamida, diminue-se a atividade antiestreptococica, enquanto ligando o mesmo radical em $N^1$ sua atividade vem melhor orientada contra as pneumo- e gonococias.

4.º) Introduzindo em $N^4$ radicais de acidos monobasicos, a atividade antibacteriana diminue ou desaparece; permanece inalterada se o radical acido tiver 5 ou 6 atomos de carbono em cadeia normal. Com os radicais de acidos bibasicos, verifica-se uma diminuição mais acentuada da atividade quimioterapica; esta atividade seria entretanto melhorada e distendida, introduzindo em $N^4$ radicais de acidos com nucleo heterociclico, especialmente piridico (ac. nicotinico, ac. piridindicarbonico, etc.).

5.º) Substituindo, em $N^4$ o H por alquilas, arilas ou aralquilas, obtêm-se derivados, menos ativos, mas ás vezes bem menos toxicos que o produto de partida (caso do benzilderivado).

6.º) Introduzindo em $N^1$ radicais acidos, a atividade quimioterapica torna-se, não raro, polivalente (caso dos derivados acetilico, dodecanoilico, etc.). A analogo resultado se pode chegar se, em vez de radicais acidos, se fixa em $N^1$ um nucleo heterociclico azotado (caso da sulfapiridina) ou azotado e sulfurado (caso do sulfatiazol).

Existem, pois, relações fundamentais entre estrutura quimica e atividade antibacteriana; porém, como acontece em muitos casos congeneres, não são, felizmente, nem muito rigidas nem extremamente constantes. Assim sendo, o campo permanece ainda e sempre aberto ás pesquizas e experimentações.

## CHEMISCHE STRUKTUR UND ANTIBAKTERIELLE WIRKSAMKEIT

### *Zusammenfassung*

*Nachdem die ersten Forschungen ueber das Prontosil und den Anteil seines Molekules, der fuer die Antistreptokokken-Wirksamkeit verantwortlich ist, in Erinnerung gerufen wurden, werden die Grundregeln herausgestellt, die 1936 von Fourneau und Mitarbeitern ueber die Beziehungen zwischen chemischer Struktur and antibakterieller Wirksamkeit aufgestell wurden.*

*Der Verf. berichtet ueber die verschiedenen Veraenderungen, die diese Grundregeln seither erlitten haben, unter Beruecksichtigung sowohl der Sulfanilamidverbindungen, wie auch der Derivate, die des* $-SO_2NH_2$ *Radikals ermangeln und Para-Disubstitute. Fuer die Derivate des Sulfanilamids werden die Veraenderungen in der antibakteriellen Wirksamkeit dargestellt, die man wahrnimmt, wenn man Saeureradikale oder Alkyl-Reste oder Aryl-Reste oder heterocyclische Kerne in die Stellungen von* $N^1$ *und* $N^4$ *einfuehrt.*

*Ausser den neuen Sulfon-Derivaten werden die juengsten chemischen Forschungen ueber die wasserloeslichen Abkoemmlinge des Sulfanilamids erwaehnt, sowie ihre Methoden der qualitativen und quantitativen Analyse.*

## BIBLIOGRAFIA


(1) ADAMS R., LONG P. H. e JOHANSON A. J., J. am. chem. soc., 61, 2342 (1939)

(2) ADAMS R., LONG P. H. e JEANES A., J. am. chem. soc., 61, 2346 (1939)

(3) BAUER H. e ROSENTHAL S., Publ. Health Rep., 53, 40 (1939)

(4) BOBRANSKI B., Arch., 277, 75 (1939)

(5) BUTTLE G. A. H., STEPHENSON D., SMITH S., DEWING T. e FOSTER G. E., Lancet, 232, 1331 (1937)

(6) BUTTLE G. A. H., DEWING T., FOSTER G. E., GRAY W. H., SMITH S. e STEPHENSON D., Biochem. J., 32, 1101 (1938)

(7) CALCO CHEMICAL Co., A. P. 2133787; Chem. Zentr., I, 3589 (1939)

(8) CALCO CHEMICAL Co., A. P. 2154248; Chem. Zentr., I, 1230 (1940)

(9) CHEM. PHARM. A. G. BAD HOMBURG, D. R. P. 676436; Chem. Zentr., II, 1926 (1939)

(10) CHEM. PHARM. A. G. BAD HOMBURG, Belg. P. 431122; Chem. Zentr., I, 249 (1940)

(11) CHINOIN GYÓGYSZER és Vegyészeti Termékek Gyára R. T., E. P. 500674 e 503271; Chem. Zentr., I, 1229 e 1230 (1940)

(12) CHOUDHURY A. K., DAS GUPTA P. e BASU U., J. indian chem. soc., 14, 733 (1937); Chem. Zentr., I, 3920 (1938)

(13) COX E. H., J. am. chem. soc., 62, 743 (1940)

(14) CROSSLEY M. L., NORTHEY E. H. e HULTQUIST M. E., J. am. chem. soc., 60, 2217, 2222 e 2225 (1938)

(15) CROSSLEY M. L., NORTHEY E. H. e HULTQUIST M. E., J. am. chem. soc., 61, 2950 (1939)

(16) CROSSLEY M. L., NORTHEY E. H. e HULTQUIST M. E., J. am. chem. soc., 62, 372 (1940)

(17) DANIELS T. C. e IWAMOTO H., J. am. chem. soc., 62, 741 (1940)

(18) DOBLE J. e GEIGER J. C., J. lab. clin. med., 23, 651 (1938); Chem. Zentr., I, 1718 (1940)

(19) DROSDOW N. S. e STAWROWSKAJA W. I., C. R. Academ. Sc. U. R. S. S., 23, 61 (1939); Chem. Zentr., II, 2813 (1939)

(20) DROSDOW N. S. e STAWROWSKAJA W. I., J. chim. gen., 9, 1642 (1939); Chem. Zentr., I, 1977 (1940)

(21) ELI LILLY Co., A. P. 2117260; Chem. Zentr., II, 2970 (1938)

(22) ELI LILLY Co., A. P. 2145799 e 2145800; Chem. Zentr., I, 3589 (1939)

(23) ELI LILLY Co., E. P. 500607; Chem. Zentr., I, 3928 (1939)

(24) FARASTAN Co., A. P. 2143829; Chem. Zentr., I, 5008 (1939)

(25) FARASTAN Co., A. P. 2182075; Chem. Zentr., I, 2349 (1940)

(26) FARMC. ZAKLADY PRZEM. A. WIENIEWICZ, Poln. P. 26608; Chem. Zentr., II, 685 (1939)

(27) FIELD SMITH H. e CARPENTER Ch. P., Science, 87, 350 (1938)

(28) FOSBINDER R. J. e WALTER L. A., J. am. chem. soc., 61, 2032 (1939)

(29) FOURNEAU E., TRÉFOUEL J. e J., NITTI F. e BOVET D., C. R. soc. biol., **122**, 258 (1936)
(30) FOURNEAU E., TRÉFOUEL J. e J., NITTI F. e BOVET D., Comp rend., **204**, 1763 (1937)
(31) GALLO U. e BALDINI V., Boll. chim. farmac. **78**, 317 (1939)
(32) GANAPATI K., J. indian chem. soc., **15**, 525 (1938)
(33) GELMO P., J. prakt. chem. **77**, 369 (1908)
(34) GIRARD A., RAY e RICHARD, Nature, **140**, 283 (1937)
(35) GLEY P. e GIRARD A., C. R. soc. biol., **125**, 1027 (1937)
(36) GLEY P., Comp. rend., **204**, 1907 (1937)
(37) GOLDYREV e POSTOVSKIY, J. chim. appl. **11**, 316 (1938); Chem. Abstr., **32**, 5801 (1938)
(38) GRAY W. H., J. chem. 1202 (1939)
(39) HOFFMANN-LA ROCHE A. G., Schw, P. 195466; Chem. Zentr., I, 2034 (1939)
(40) HOFFMANN-LA ROCHE A. G., D. R. P. 666431; Chem. Zentr., I, 2249 (1939)
(41) HOFFMANN-LA ROCHE A. G., Schwz. P. 199682, 199683 e 199684; Chem. Zentr., I, 2885 (1939)
(42) HOFFMANN-LA ROCHE A. G., Schwz, P. 200845; Chem. Zentr., II, 685 (1939)
(43) HOFFMANN-LA ROCHE A. G., D. R. P. 678115; Chem. Zentr., II, 2814 (1939)
(44) HYKES O. V. e D. E. e RERABEK J., C. R. soc. **126**, 635 (1937)
(45) J. amer. med. ass., **114**, 9 de Março (1940)
(46) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., Ind. 24731; Chem. Zentr., I, 1205 (1939)
(47) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G. Schwz. P. 197427; Chem. Zentr., I, 2034 (1939)
(48) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G. Schwz. P. 199315; Chem. Zentr., I, 3225 (1939)
(49) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., F. P. 830754; Chem. Zentr., I, 3589 (1939)
(50) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., E. P. 487233; Chem. Zentr., II, 2622 (1938)
(51) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., E. P. 484421; Chem. Zentr., II, 2972 (1938)
(52) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., Ind. P. 25529; Chem. Zentr., II, 1123 (1939)
(53) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., Schwz. P. 204158; Chem. Zentr., I, 1230 (1940)
(54) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., E. P. 513242; Chem. Zentr., I, 2031 (1940)
(55) I. G. FARBENINDUSTRIE A. G., F. P. 845532; Chem. Zentr., I, 2505 (1940)
(56) KERMACK W. O., SPRAGG W. T. e TEBRICH W., J. chem. soc., 608 (1939)
(57) KOLLOFF H. G., J. am. chem. soc., **60**, 950 (1938)
(58) KOLLOFF H. G. e HUNTER J. H., J. am. chem. soc., **62**, 158 (1940)
(59) KREBS K. G. e FRANKE H., Klin. Wschr., **18**, 1248 (1939)
(60) LABOPHARMA Dr. LABOSCHIN G. m. b. H., D. R. P. 683866; Chem. Zentr., I, 914 (1940)
(61) LANNUNG A., Arch. pharm. og Chem. Kopenhagen, **45**, 615 (1938); Chem. Zentr., I, 2032 (1939)
(62) LEVADITI C., GIRARD A. e VAISMAN A., C. R. soc. biol., **127**, 19 (1938)
(63) LEVADITI C., GIRARD A. e VAISMAN A., C. R. soc. biol., **128**, 305 (1938)
(64) LEVADITI C., VAISMAN A. e KRASSNOFF D., Bull. Acad. méd. **121**, 730 (1939)
(65) LOTT A. W. e BERGEIM F. H., J. am. chem. soc., **61**, 3593 (1939)
(66) MAC LACHLAN E. A., CAREY Jr. B. W. e BUTLER A. M., J. lab. clin. med., **23**, 1273 (1938)
(67) MAY & BAKER Ltd., E. P. 512145; Chem. Zentr., I, 2504 (1940)
(68) MAY & BAKER Ltd., E. P. 484449; Chem. Zentr., II, 2971 (1938)
(69) MAYER R. L. e OECHSLIN Ch., C. R. soc. biol., **130**, 211 (1939)
(70) MAZZA F. P. e MIGLIARDI C., Atti R. Accad. Lincei, VI, **28**, 152 (1938)

(71) MERCK E., F. P. 847244; Chem. Zentr., I, 2201 (1940)
(72) MEYER E. J. E., Pharmac. Weekbl., 76, 977 (1939)
(73) MEYER F., A. P. 2141843; Chem. Zentr., II, 1123 (1939)
(74) MIKÓ G., Pharm. Zentr. Deutschl., 80, 198 (1938)
(75) MILLER E., ROCK H. J. e MOORE M. L., J. am. chem. soc., 61, 1198 (1939)
(76) MINGOJA Q., Arquivos de Biologia, n.º 208, 157 (1938)
(77) MINGOJA Q., Arquivos de Biologia, n.º 203, 27 (1938)
(78) MINGOJA Q., Arquivos de Biologia, n.º 218, 158 (1939)
(79) MINGOJA Q., Arquivos de Biologia, n.º 201, 161 (1937); n.º 206, 97 (1938); n.º 214, 50 (1939)
(80) MINGOJA Q. e ROCHA E SILVA M., Arquivos do Instituto Biologico, 10, 249 (1939)
(81) MINGOJA Q. e KARMANN G., Trabalho no prelo em Arquivos de Biologia
(82) MOSSINI A., Boll. chim. farmac., 78, 429 (1939)
(83) MOUNEYRAT A., F. P. 849504; Chem. Zentr., I, 2032 (1940)
(84) MOUNEYRAT A., F. P. 850553; Chem. Zentr., I, 2504 (1940)
(85) MOUNEYRAT ÉTABL. & Cie., F. P. 839711; Chem. Zentr., II, 2815 (1939)
(86) ONETO J. F. e WAY E. L., J. am. chem. soc., 61, 2105 (1939)
(87) ORGACHEMIA N. V., F. P. 843429 e 845317; Chem. Zentr., I, 1390 (1940)
(88) PENCE L. H. e WINTHER H. C., J. am. chem. soc., 61, 2977 (1939)
(89) RAIZISS G. W., CLEMENCE L. W., SEVERAC M. e MOETSCH J. C., J. am. chem. soc., 61, 2763 (1939)
(90) RHÔNE POULENC Soc. Usin. Chim., F. P. 812053; Chem. Zentr., II, 814 (1937)
(91) RHÔNE POULENC Soc. Usin. Chim., E. P. 483945; Chem. Zentr., II, 1638 (1938)
(92) ROSENTHAL S. M., BAUER S. e ELVOVE E., Publ. Health Rep., 54, 1317 (1939)
(93) ROSICKY J., Tschech. P. 60736; Chem. Zentr., I, 1601 (1939)
(94) ROSICKY J. e OSTRCIL J., Médec. prat., 17, 41 e 69 (1937)
(95) SANABO FABRIK chem, pharm. Produkte, D. R. P. 156638; Chem. Zentr., II, 2946 (1939)
(96) SCHERING KAHLBAUM A. G., E. P. 502558; Chem. Zentr., II,1123 (1939)
(97) SCHERING KAHLBAUM A. G., E. P. 510127; Chem. Zentr., I, 249 (1940)
(98) SCHERING KAHLBAUM A. G., F. P. 842726; Chem. Zentr., I, 758 (1940)
(99) SCUDI J. V., Ind. Engng. chem. Anal. ed., 10, 346 (1938)
(100) SEPPI G., Ann. chim. farmac., 2, 32 (1939)
(101) SIEGFRIED B., Schwz. P. 194761; Chem. Zentr., II, 2971 (1938)
(102) SIEGFRIED B., Schwz. P. 198137; Chem., I, 4650 (1939)
(103) SIEGFRIED B., Schwz. P. 199674 e 199675; Chem. Zentr., I, 3225 (1939)
(104) SQUIBB E. R. & Sons, A. P. 2161407; Chem. Zentr., I, 2885 (1939)
(105) TOWNE R. W. e HITCHENS R. M., J. am. pharm. ass., 28, 585 (1939)
(106) TRÉFOUEL J. e J., NITTI F. e BOVET D., C. R. soc. biol., 120, 756 (1935)
(107) TRÉFOUEL J. e J., NITTI F. e BOVET D., Ann. Pasteur, 58, 30 (1937)
(108) WELLCOME FOUNDATION Ltd., E. P. 491265; Chem. Zentr., II, 2825 (1939)
(109) WERNER A. E. A., Lancet, 236, 18 (1939)
(110) WINTERBOTTOM R., J. am. chem. soc., 62, 160 (1940)
(111) WINTHROP CHEMICAL Co., A. P. 2167719; Chem. Zentr., I, 1230 (1940)
(112) WOELM M., E. P. 490350; Chem. Zentr., I, 2249 (1939)

N. B. — A presente bibliografia está, relativamente, em dia até 1.º de Maio de 1940.

———o———

# TINGITIDEOS NOVOS OU POUCO CONHECIDOS DA FAUNA AMERICANA

POR

Oscar Monte

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 8 figuras no texto

O presente trabalho é o resultado dos estudos sôbre abundante material que, por gentilesa de varios amigos, o autor tem recebido para exame. A todos quantos o têm auxiliado nestas pesquizas confessa-se ele muito agradecido.

Incluem-se aqui comentários sôbre espécies mal definidas, para que de futuro não haja, a seu respeito confusão, na literatura, o que viria dificultar enormemente os estudos dos que se interessam pelos tingitideos. Os tipos estão na coleção particular do autor.

## 1 — *Tingis neotropicalis*, n. sp.

Colorido geral amarelo, sem manchas. Cabeça castanha com cinco espinhos amarelos e erectos; os do par anterior curtos e tocando-se; o mediano longo; o par posterior longo e bastante erecto. Antenas longas, amareladas, salvo o último segmento. O I, uma vez e meia maior do que o II; o III de quasi três vezes o comprimento do IV; êste, do dôbro do I, escuro, com base clara, e peludo.

Pronoto bastante convexo e puncturado; o colo largo e bastante levantado no meio; tricarenado; as carenas, baixas, não areoladas; a mediana um pouco mais alta. Paranoto estreito, um pouco mais largo na frente e aí uniseriado, e da metade até o ângulo lateral do pronoto, sem aréolas e com margens serreadas.

Élitros longos, com área costal quasi totalmente biseriada, sendo as células da metade anterior bem menores, apresentando-se esta área mais alargada para o ápice; levemente reflexos e com margens serreadas; subcostal larga, na maior parte quadriseriada; discoidal comprida e passando da metade dos élitros. Parte inferior do corpo amarelada. Rostro amarelado, longo, com o ápice escuro, alcançando o metasterno.

Comprimento 2.64 mms.; largura 1.00 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 17 parátipos colhidos em Murici-mirim *(Byrsonima*, sp.), Malpiguiácea, em 13-7-1939, Água Preta, Baía, pelo DR. PEDRITO SILVA. 2 parátipos na coleção do Instituto Biológico.

A presente espécie não se aproxima de nenhuma das já descritas; parece mais próxima de *T. saueri* D. & H., pertencendo à divisão de *T. silvacata* DRAKE.

2 — *Amblystira hirta*, n. sp. (fig. 5)

Larga, preta, pronoto brilhante, élitros escuros salvo nas áreas costal e sutural; pernas amareladas; pronoto e élitros cobertos de delicados pêlos.

Cabeça convexa, com o par posterior de espinhos desenvolvido, os outros, quasi nulos; olhos grandes e pretos; antenas moderadamente longas, delgadas, amareladas, o último segmento escuro com a base testácea e coberto de pêlos. O I segmento, do dobro do II; o III, duas vezes e meia maior que o IV e cinco vezes que o I; o IV, maior que os dois primeiros juntos.

Pronoto bastante convexo, brilhante, com puncturação bem distinta, tricarenado; as carenas baixas, e a mediana um pouco mais alta, com 2-3 células na frente e mais levantada atraz, as laterais convergindo levemente para a porção triangular. Paranoto semelhante ás carenas, com uma série de minúsculos espinhos; o colo bastante levantado, formando uma delicada vesícula.

Élitros largos na base, estreitando-se bastante para o ápice; área costal irregularmente biseriada, tendo na base uma série de cinco carreiras de uma só célula, larga, no meio biseriada e aí formada primeiramente por uma dupla carreira de células quasi punctiformes e depois largamente uniseriada; subcostal na maior parte triseriada, com quatro carreiras na sua maior largura; discoidal bastante larga e piriforme; a nervura que limita as áreas discoidal e subcostal é levantada e sinuosa, formando-se aí uma pequena elevação túmida; a sutural formada de células largas e fôscas.

Búcula fechada. Rostro curto e abertura rostral bem larga.

Parte inferior do corpo totalmente preta.

Comprimento 3.33 mms.; largura, 1.50 mms.

Holótipo (fêmea), Catanduva, S. Paulo, 19-VIII-1940, colhido pelo autor.

Esta espécie é tão distinta, que isso justifica a sua descrição segundo um unico espécimen. Pela formação dos élitros tem o aspecto do gênero *Sphaerocysta*.

3 — *Corythaica costata* Gibson

Quatro exemplares de Guadelupe, Jequetepeque, Perú, 10-III-1939, Dr. J. Wille, leg.; 15 exemplares de Portoviejo, Equador, colhidos sôbre *Lycopersicum esculentum* L., pelo Dr. Francisco Campos.

Espécie bem distinta pela sua área costal largamente uniseriada e fortemente estrangulada além do meio; entretanto, oito dos exemplares de Portoviejo têm esta área biseriada em quasi toda a metade anterior.

O tipo é de S. Clara, Perú. E' a primeira citação que se faz da espécie para o Equador. E' tambem a primeira referência sôbre ela depois da descrição original.

4 — *Corythaica cucullata* (Berg)

Treze exemplares de Córdoba, Argentina, 10-VI-1940, Dr. A. Ogloblin, leg., colhidos sôbre *Sphaeralcea miniata* (Cav.) Spach., uma

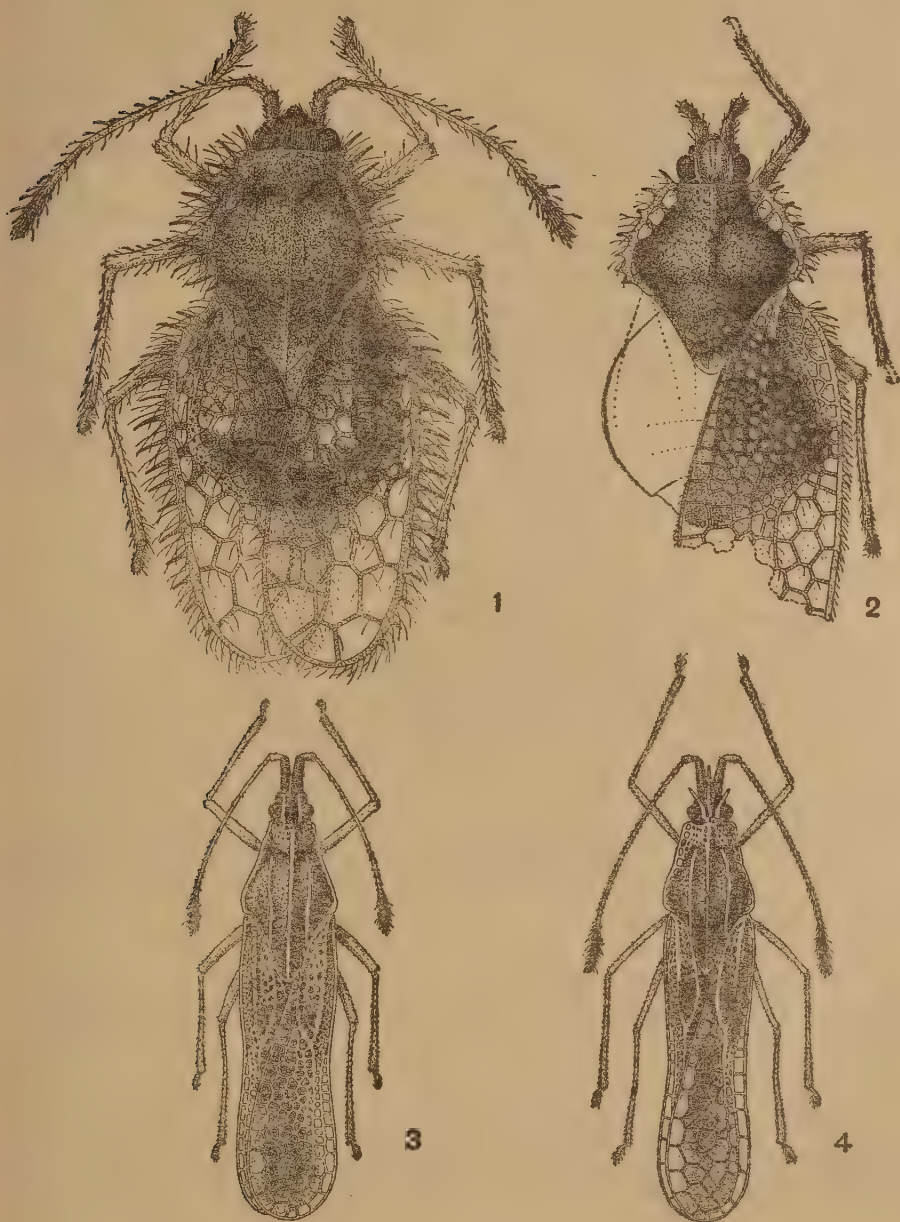



Fig. 1 - *Acanthocheila denieri* MONTE, n. sp. — Fig. 2 - *Acanthocheila exquisita* UHLER (Parátipo) — Fig. 3 - *Campylotingis lenatis* DRAKE — Fig. 4 - *Campylotingis prudens* D. & H. (Parátipo). (Ruth S. de Carvalho, del.)

malvácea. A vesícula de *cucullata* é um pouco mais longa e menos alargada na base do que a de *costata*. As espécies diferenciam-se pela área costal em parte uniseriada em *costata* (ás vezes totalmente), pelo aspecto do paranoto, que é reflexo e estreitado em *costata* e mais ou menos plano e bem mais largo em *cucullata*. *Corythaica bosqi* MONTE é espécie bem distinta das duas antecedentes; em *bosqi* o paranoto é muito estreito e a área costal é, na maior parte, uniseriada.

A espécie é um tanto variável quanto ao formato do paranoto; a área costal tem em dois dos exemplares, uma carreira adicional, triseriada; a elevação túmida da discoidal varía outrossim; a carena mediana é biseriada somente no meio.

Agradeço ao DR. MAX BIRABÉN ter-me permitido o estudo do tipo (Museo de La Plata), e a JUAN M. BOSQ a sua intervenção junto à direção do Museu.

Depois da coleta do material típico, por LYNCH, em Baradero, Prov. de Buenos Aires, somente agora foi novamente colhida esta espécie, tornando-se também conhecida a planta sua hospedeira.

## 5 — *Leptobyrsa pulchra*, n. sp.

Aparência geral de *L. tersa;* paranoto mais curto, mas muito semelhante na forma; elevação dos élitros muito menor; as margens dos élitros com maior número de pêlos, e êstes mais longos; vesícula menor. Colorido mais ou menos como em *L. tersa*, um tanto mais transparente; antenas claras e cobertas de pêlos; o I segmento, de três vezes o II; o III mais de duas vezes e meia o IV; êste, com a porção terminal escura. Cabeça com 5 longos espinhos, o par posterior deitado sôbre a superfície da cabeça e os outros três, erectos. Rostro curto, não alcançando a sutura meso-metasternal.

Élitros com as células largas, a área costal biseriada e com três carreiras na sua maior largura; elevação dos élitros pequena e não tão excavada como em *tersa*. As asas passando um pouco o abdómen. Todos os outros caracteres semelhantes a *L. tersa* D. & H.

Comprimento 3.25 mms.; largura 2.25 mms.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 8 parátipos, de Nova Teutonia, S. Catarina, colhidos em 5-V-1938, pelo SR. FRITZ PLAUMANN.

## 6 — *Pleseobyrsa plicata* (CHAMPION)

Um exemplar de Carreteras Maracay-Ocumare, Aragua, Venezuela, em 26-XII-1939, colhido pelo DR. RENÉ LICHY. O tipo é de Bugaba, Panamá; não mais colhida, depois da descrição original.

## 7 — *Pleseobyrsa adversa* (DRAKE & HAMBLETON)

Possuo um parátipo desta espécie, que me convenceu de não poder ela permanecer no gênero *Leptopharsa*. E' extremamente pró-

xima de *P. mollinediae* (D. & H.), da qual se afasta pela disposição da subcostal; a nervura que limita as áreas discoidal e subcostal, não muito levantada; o paranoto levemente mais alargado na parte humeral.

8 — *Planibyrsa splendida* (DRAKE)

Um exemplar de Catanduva, S. Paulo, 18-VIII-1940, colhido pelo autor. O tipo é de Chapada, Mato Grosso, e um parátipo, de S. Antonio, Baía. Até agora somente conhecido o material típico.

9 — *Acanthocheila kahavalu* KIRKALDY

Tres exemplares de Chancha Mayo, Perú, 14-XI-1935, DR. J. WILLE, leg.; 4 exemplares de Parintins, Amazonas, E. BALINT, leg. Não colecionada ainda no Brasil; o tipo foi descrito de Callanga, Perú. Agradeço ao DR. H. G. BARBER, do U. S. Nat. Mus., (tipo n. 25.152, da coleção dêste Museu), o ter confirmado minha determinação.

10 — *Acanthocheila visenda* D. & H.

Um exemplar, Jujuy, Argentina, 17-X-1938, JUAN M. BOSQ, col. E' a primeira citação que se faz da espécie fora da fauna brasileira.

11 — *Acanthocheila hollandi* DRAKE

Tres exemplares de Jujuy, Argentina, 17-X-1938, JUAN M. BOSQ, col. Ainda não conhecida na fauna argentina.

12 — *Acanthocheila denieri*, n. sp., (fig. 1)

Espécie afim de *A. hollandi* DRAKE, mas bem menor, a carena mediana menos elevada e a elevação túmida maior.

Cabeça sem espinhos; antenas mais ou menos longas, amareladas, com poucos pêlos; o 1.º segmento, do dobro do 2.º; o 3.º de quasi duas vezes o tamanho do 4.º.

Rostro alcançando o 2.º par de patas; búcula aberta na frente.

Pronoto levemente elevado, bem puncturado, pardo-escuro, unicarenado, a carena não tão distinta como em *hollandi;* o processo triangular, amarelado no ápice; vesícula quasi nula. Paranoto estreito, uniseriado, com aréolas mais largas na frente; margens dos paranotos e élitros armados com espinhos e trazendo numerosos pêlos finos; pronoto e nervuras dos élitros com pêlos.

Élitros com a metade basal escura; área costal com nervuras muito escuras, biseriada na frente e uniseriada atraz; elevação túmida curta, mas um pouco elevada.

Asas passando o abdômen. Patas amareladas.

Comprimento 2.04 mms.; largura 1.00 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea), de Clorinda, Formosa, Argentina, 16-X-1937, DR. PEDRO DENIER, leg.

A espécie é muito próxima de *A. hollandi* DRAKE, da qual se distingue pelos caracteres acima enumerados, pricipalmente por possuir os élitros muito mais curtos e densamente cobertos de pêlos, e pela elevação túmida muito mais alta.

A espécie é dedicada, numa homenagem especial, ao DR. PEDRO DENIER, que muito se tem interessado pelos estudos de tingitideos americanos.

13 — *Acanthocheila nexa* DRAKE

Um exemplar de Guarani (Horto Florestal), S. Paulo, colhido pelo autor em 30-VII-1940, sôbre uma planta rasteira. Êste espécimen passa a ser o alótipo (macho), em minha coleção, desde que a espécie foi descrita por um único exemplar fêmea, de Loreto, Argentina.

A espécie pode ser confundida com *Acanthocheila visenda* D. & H., distinguindo-se dela pela área costal uniseriada até a metade dos élitros, a qual é biseriada em *visenda;* paranoto uniseriado, mas com células menores; a elevação túmida semelhante a *visenda.* DRAKE & HAMBLETON, na descrição de *visenda* (Rev. Ent., vol. 4, fasc. 4, p. 442), dizem: "Paranota rather narrow, uniseriate in front and biseriate behind". Os exemplares colhidos por mim em Minas Gerais e S. Paulo, e o que me foi enviado da Argentina, não apresentam o paranoto biseriado atraz; um parátipo de *visenda,* em minha coleção (HAMBL., leg.), está nas mesmas condições. Seria êste um outro carater diferencial para as duas espécies, o que entretanto não acontece. As medidas conferem (comp. 2.73 mms.; larg. 1.15 mms.).

Um único exemplar não basta para uma comparação entre as espécies; entretanto, meu espécimen concorda bem com a diagnose e desenho apresentados por DRAKE (Tr. Inst. Zool. Ac. Sc., URSS, III, p. 700, 1936).

*Acanthocheila nexa* foi descrita por um único exemplar e posteriormente a *Acanthocheila visenda* (1934); entretanto, na descrição de *nexa,* nada se fala da proximidade das duas espécies.

14 — *Acanthocheila exquisita* UHLER (fig. 2)

Dada a gentileza dos DRS. J. C. BRADLEY e H. DIETRICH, de Cornell University, Ithaca, N. Y., U. S. A., foi-me permitido estudar um cótipo desta rarissima espécie. O exemplar está bastante estragado, como se pode verificar no desenho, e por ser ela bastante rara nas coleções, pareceu-me útil transcrever sua diagnose original e redescrevê-la em português, fazendo-lhe alguns comentários.

"*A. exquisita.* New sp. — Form similar to that of *Gargaphia;* ovate, the wing-covers transparent throughout, excepting the clavus and adjoining field of

the corium; abdomen and pectus black, the former polished, the latter opaque; head rounded, impunctate, set with rows of minute bristles, unarmed; vertex grooved, having a white carina each side at the suture bounding the inner side of the eyes; eyes round, brown; antennae testaceous, moderately slender, rather longer than the head and thorax combined; clavate, the basal joint very thick, shorter than the head, armed with stout, strong bristles; the second joint almost as thick, bristly, subconical; third, very long, slender set with slender erect hairs; fourth, fusiform, not as thick as the basal ones, but longer than both conjoined, bristly, with the apical half blackish; bucculae testaceous or ochreous; rostrum and tylus ochreous, the former extending behind the middle coxae, thorax either ochreous or blackish, with ochreous lateral network, the surface with remote sunken punctures, and short, sparse setae; lateral margins slightly expanded into curved lobes, with a series of five quadrangular cells each side, and having the outer edge armed with six or seven long acute spines tipped with black; anterior lobe small, deeply intended, bearing a slender pale carina along the middle, which is less distinctly carried back on the posterior lobe; the posterior lobe dull, trapezoidal, sub-acutely deltoid behind, white a tip; pectoral pieces more or less margined with testaceous; the ante-pectoral flaps remotely granulated; legs testaceous, clothed with slender bristles; scutellum minute, black, covered at base by the truncated tip of the produced pronotum; hemelytra coriaceous throughout, an oval area at base, which includes the clavus; this portion is coarsely sunken-punctate; exterior to this the sagenae have two, or at most three, series of net-work areoles, which increase in size posteriorly, so that six series of irregular rhomboidal cells form the whole width of the corium behind the middle; the costal margin has a series of about seventeen gradually diminishing spines, extending from the contracted base to beyond the middle; the veins of the surface generally set with minute bristles throughout; length to tip of abdomen 2¼, to end of hemelytra 3-3½ millims.; width across the pronotum scarcely 1 millim.

Only four specimens of this interesting insect were present in this collection three of which were females and the fourth a male. The male is more transparant, and has more clean cut black markings than any of the females.

The specimens were found near Cape Florida in the month of May." (Uhler, Proc. Ent. Soc. Wash., I, p. 143, 1889).

### Redescrição

Cabeça castanha clara, bastante convexa, com a linha mediana regularmente excavada; espinhos posteriores longos, testaceos, grossos, bem juntos da superficie da cabeça e correndo junto dos olhos; o mediano, ausente; olhos bem desenvolvidos e de um castanho escuro; antenas com o I e II segmentos testaceos, o I um pouco maior que o II, mais grosso e trazendo pêlos; os outros ausentes.

Pronoto convexo, preto, um tanto puncturado, com leve secreção esbranquiçada; carena mediana um tanto saliente, testacea, salvo o centro, que é escuro; colo largo, muito distinto e na mór parte escuro; porção triangular truncada, terminada por duas células bem largas.

Paranoto largo, reflexo, castanho rubro, uniseriado, de células bem largas, quadrangulares, diminuindo para traz, armado com uma série de 7-8 longos espinhos testáceos, com extremidade enegrecida.

Élitros largos, com uma estreita faixa escura cêrca do meio; costal largamente biseriada na frente, na metade as células internas quasi punctiformes,

e depois irregularmente triseriada; subcostal bem larga, em declive, com 4 carreiras de aréolas na sua maior largura; a discoidal larga e aberta, com 4 carreiras de aréolas; as nervuras e aréolas da discoidal, parte central da subcostal e 2-3 carreiras da costal, escuras; as outras nervuras, castanho-vermelhas.

Parte inferior, escura. Lâmina rostral baixa e com abertura larga. Rostro curto.

♀ — Biscaya-Florida, 18-V
co-Type, Cornell Un., Lot. 586, sub. 57 (rótulo vermelho).
Paratype, Cornell Un., n.º 1671 (rótulo azul).

Medidas: da cabeça até a porção triangular: comp., 1.42 mms.; largura, 1.62 mms.; da cabeça até a parte final dos élitros, representada no desenho: 3.00 mms.; até a ponta do abdómen: 2.00 mms.

A espécie é mais próxima de *A. armigera* (STAL), da qual se afasta especialmente pela presença de espinhos na margen da área costal; tem a área costal mais estreitada; sub-costal levantada; a discoidal aberta.

A sua forma é típica do gênero *Acanthocheila,* não apresentando, a meu ver, nenhuma semelhança com o gênero *Gargaphia.* UHLER fala, na sua descrição, em 4 espécimens (3 fêmeas e 1 macho); dêstes existem em Cornell Un., somente dois exemplares, segundo informação particular do DR. DIETRICH: "The original description calls for 4 specimens, but we have only two. The holotype here is in better shape than the paratype..."

### 15 — *Campylotingis lenatis* DRAKE (fig. 3)

Tres exemplares, S. Paulo, sôbre *Machaerium,* sp. O tipo é de S. Bernardino, Paraguai.

### 16 — *Campylotingis prudens* DRAKE & HAMBL. (fig. 4)

Muitos exemplares de Belo Horizonte, colhidos sôbre *Machaerium villosum* VOG., em 9-II-1938, pelo autor.

### 17 — *Leptopharsa spectabilis,* n. sp. (fig. 7)

Cabeça preta, com o espinho mediano bem erecto, claro e mais ou menos longo; o par anterior quasi reduzido a vestígios; o posterior, ás vezes, consiste em filamentos que descançam na superfície da cabeça. Antenas muito longas, com pêlos, amareladas, salvo o 4.º segmento. O I segmento bem longo, reto, levemente estrangulado na base, tres vezes e meia maior do que o II; êste muito curto; o III muito longo, reto e duas vezes e meia maior que o IV, sendo êste último bastante piloso e quasi do dôbro do I.

Rostro curto, alcançando a sutura do metasterno. Búcula contigua na frente, larga e distintamente reticulada.

Pronoto convexo, preto, lustroso, bastante puncturado, a porção triangular clara e reticulada; tricarenada; a carena mediana, alta, um pouco mais elevada na porção posterior, com uma carreira de largas aréolas; as laterais um pouco mais baixas, com uma simples carreira de aréolas, paralelas, mas levemente constrictas além do meio. Vesícula alta e globosa; paranoto largo, reflexo, na mór parte triseriado, mas biseriado nas extremidades.

Élitros largos, reflexos, divergindo posteriormente, com as margens serreadas; área costal larga, reflexa, triseriada, depois quadri e finalmente quinqueseriada na sua maior largura, com aréolas dispostas irregularmente; a subcostal larga e em declive, com 4 carreiras de aréolas, das quais a que se limita com a discoidal é bem larga; uma faixa larga, preta, corta os élitros em sentido obliquo, alcançando o ápice e correndo numa carreira de células deprimidas.

Colorido geral escuro, com a vesícula, paranotos, carenas e área costal, esbranquiçadas.

Comprimento 4.00 mms.; largura, 2.00 mms.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 20 parátipos colhidos pelo autor, em 30-VII-1940, em Pitangueiras, S. Paulo. Outros exemplares de Araraquara. Parátipos no Instituto Biológico.

A espécie é distinta de todas as que foram até agora descritas e no seu aspecto mais se parece com *Gargaphia munda* (STAL).

## 18 — *Leptopharsa flava*, n. sp.

Muito larga e de colorido palha. Cabeça escura, um tanto convexa, espinho mediano muito longo, erecto, pálido e enegrecido na extremidade; o par posterior muito curto e o anterior bastante delicado e repousando na superfície da cabeça.

Antenas longas, testáceas, com o IV segmento escuro; o I segmento longo, quatro vezes tão longo quanto o II; o III um pouco mais de tres vezes maior que o IV; e êste igual á soma dos dois primeiros.

Pernas longas, delgadas, amareladas; tarsos escuros.

Pronoto pardacento, mais escuro entre as carenas, levemente convexo, densa e delicadamente puncturado, reticulado atraz; tricarenado; as carenas moderadamente levantadas, compostas, cada uma, de uma simples carreira de aréolas; carenas laterais paralelas e um pouco mais baixas do que a mediana; na parte central da mediana, uma mancha escura.

Vesícula alta, apertada, formada de aréolas largas e não lançada para a frente. Paranoto largo e fortemente reflexo, triseriado na frente, biseriado atraz, as margens externas arredondadas.

Élitros muito largos, com as margens arredondadas, alargando-se posteriormente, as extremidades separadas; área costal bastante alargada, 7-8 carreiras de aréolas na sua maior largura, cinco perto da base, todas as nervuras enfuscadas e não formando uma mancha escura no terço anterior como em *L. farameae* D. & H.; subcostal muito estreita, formada de tres carreiras de pequenas células; discoidal não alcançando o meio dos élitros, um tanto larga, com as nervuras do ápice escuras formando uma mancha, a nervura externa não levantada.

Comprimento 4.00 mms.; largura, 2.80 mms.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea), (somente com um dos élitros) e 3 parátipos de Água Preta, Baía, em 24-VII-1938, sôbre Brincos de café, colhidos pelo DR. PEDRITO SILVA.

Difere de *L. farameae* D. & H., pelo formato da vesícula, menos globulosa, e pela área subcostal e o paranoto muito mais estreitados.

### 19 — *Leptopharsa vittipennis* (STAL)

O tipo de *Leptopharsa vittipennis* (STAL), que devo á gentilesa do DR. RENÉ MALAISE, do Naturhistoriska Ricksmuseets, de Estocolmo, infelizmente só apresenta os élitros, pelo que não permite um estudo.

Os comentários feitos por DRAKE a esta espécie e as comparações que dela faz, não estão de acôrdo com os fatos. Em Mem. Carn. Mus., XI, p. 307, DRAKE & POOR, escrevem: "Resembles *L. furculata* CHAMPION, in color and general appearance, but longer, with wider costal area and fuscous black basal segment of antennae". Não possuo *L. furculata* CHAMPION em minha coleção, mas quem comparar os desenhos dos tipos de *L. vittipennis* STAL (Mem. Carn. Mus., XI, pl. XXXVI, fig. 11) e de *L. furculata* CHAMPION (Biol. Centr-Amer., Rhynch. II, tab. 2, fig. 5), verificará desde logo que justamente *L. furculata* é que possue a área costal mais larga. *L. vittipennis* tem a área costal na maior parte biseriada e triseriada na maior largura, enquanto *L. furculata* tem "costal area with three or four rows of areolae at the middle and two or three at the base" (CHAMPION).

Ha uma espécie extremamente próxima de *L. vittipennis* (STAL), e é *L. forsteroniae* D. & H.

Na diagnose de *Leptopharsa patria* D. & H. lê-se: "*L. vittipennis* (STAL) is a much longer species": entretanto, *L. patria* é mais longa e muito mais larga, sendo por isso espécie muito maior. Examinando-se as medidas fornecidas pelos autores, verificar-se-á para *L. vittipennis* (STAL), 3.00 mms., e para *L. patria* D. & H., 3.30 mms. As medidas tomadas por mim, da base dos élitros, dão para *L. vittipennis* 2.00 mms. e para *L. patria* 2.74 mms.; largura de *L. patria* 1.66 mms.; de *L. vittipennis* 1.04 mms. As minhas medidas são tomadas para a largura por cima da área discoidal; talvês seja essa a razão por que não coincidem com a que DRAKE apresenta para *L. patria*.

### 20 — *Leptopharsa furcata* (STAL)

Doze exemplares, de Santos, S. Paulo, colhidos pelo autor sôbre *Rudgea villiflora* K. SCHUM. (J. F. TOLEDO, det.), uma rubiácea. Até agora somente conhecido o material típico, do Rio de Janeiro.

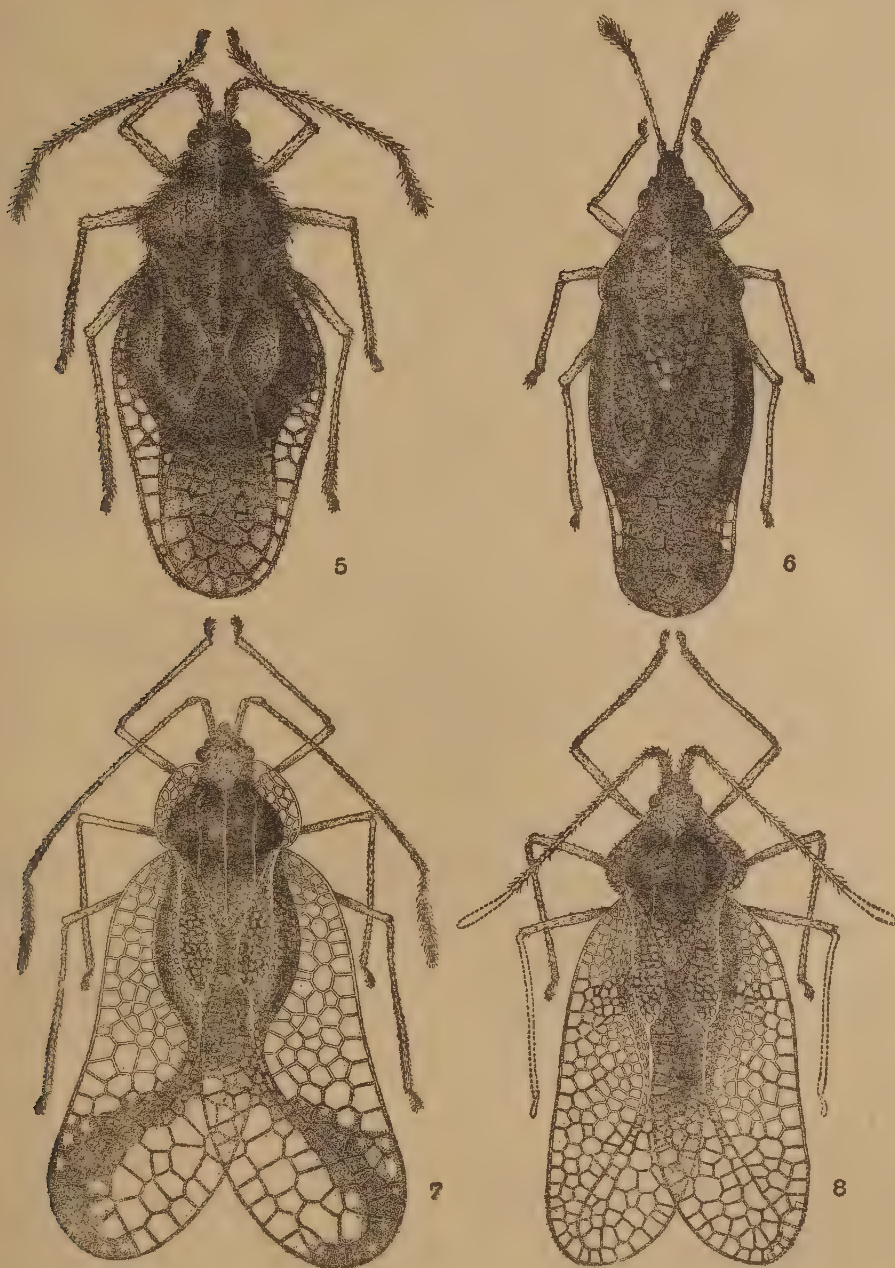



Fig. 5 - *Amblystira hirta* MONTE, n. sp. — Fig. 6 - *Corycera rocha-limai* MONTE, n. sp. — Fig. 7 - *Leptopharsa spectabilis* MONTE, n. sp. — Fig. 8 - *Gargaphia formosa* (STAL) (Parátipo). (Ruth S. de Carvalho, del.).

### 21 — *Leptopharsa ornata*, n. sp.

Moderadamente alongada e larga; corpo escuro; área costal, paranoto e vesícula, claros; élitros com uma faixa escura, obliqua, estreita, extendendo-se pela nervura mediana até ao ápice, e alargando-se um pouco para a parte final. Cabeça com 5 espinhos; os 3 frontais bem desenvolvidos e erectos; o par posterior descançando na superfície da cabeça. Antenas com os 2.º e 3.º segmentos claros; o 1.º castanho e o 4.º escuro, com base clara, e peludo. O I segmento é do dôbro do II; o III do dôbro do IV; o III segmento é cinco vezes maior que o I.

Pronoto um tanto levantado, escuro, levemente puncturado, com o processo triangular claro; coberto por forte exudação esbranquiçada, junto á vesícula; esta é curta, oval e bem levantada; paranoto relativamente largo, com duas carreiras de largas aréolas; carenas levemente erguidas, uniseriadas, sendo a mediana a mais alta; as carenas laterais levemente constrictas no meio; paranoto totalmente biseriado, um tanto largo e arredondado.

Rostro longo, alcançando o mesosterno.

Élitros largos, com os ápices afastados e arredondados; área costal quasi totalmente triseriada, somente uma ou duas carreiras no meio, quadriseriada; subcostal larga, triareolada; discoidal com 4 carreiras de aréolas na sua maior largura e não alcançando a metade dos élitros; as aréolas da sutural enfuscadas, exceto 4 grandes células que ficam na parte interna.

Parte inferior do corpo, escura. Pernas amareladas.

Comprimento 3.21 mms; largura, 0.86 mms.

Holótipo (fêmea) e um parátipo, de Sur Yungas, Chulumani, 1700 mts., Bolivia, III-1931, colhidos pelo Dr. Pedro Denier.

A espécie é próxima de *L. furculata* Champion, da qual se distingue pelo paranoto mais estreito, a faixa escura da área sutural menos pronunciada, e pela área costal mais estreitada.

### 22 — *Gargaphia formosa* (Stal) (fig. 8)

Um exemplar de Nova Friburgo, Estado do Rio, Dr. H. Sousa Lopes, leg. Inúmeros outros colhidos pelo autor sôbre *Solanum concinnum* Schot (J. F. Toledo, det.), em 2-III-1940, S. Paulo, Capital.

Sómente um parátipo de Stal, de que disponho, permitiu-me determinar com segurança esta espécie. Agradeço ao Dr. René Malaise, do Naturhistoriska Museum, de Estocolmo, a gentileza da remessa de alguns tipos e parátipos de Stal para meus estudos.

O parátipo, um macho (representado no desenho), confere perfeitamente com o exemplar de Nova Friburgo e com os machos colhidos por mim; a fêmea difere um pouco: é mais larga. Esta espécie é extremamente variável: a mancha formada pelas nervuras no terço anterior da área costal desaparece em muitos exemplares; o paranoto em alguns exemplares é manchado de preto, em outros, totalmente claro; a área discoidal é muito mais larga na fêmea do que no macho.

Por ser um tanto lacônica a descrição original de Stal (Rio Hem., I, p. 61) e porque as notas apresentadas por Drake & Poor

(Mem. Carn. Mus., vol. XI, p. 310) estão incompletas, redescrevo o parátipo em meu poder:

Cabeça com 5 espinhos, o par anterior muito curto; o posterior mais ou menos descançando na superfície da cabeça; o mediano erecto e mais grosso que os demais. Pronoto escuro, convexo, tricarenado, cada carena composta de uma simples carreira de largas aréolas; a carena mediana mais alta e formando no meio um ângulo. Paranoto largo, bastante reflexo, com 2-3 carreiras e 4 na sua maior largura, mas as aréolas irregularmente dispostas e com nervuras escuras. Vesícula moderadamente alta e comprimida dos lados.

Antenas pilosas, longas; o I e II segmentos castanho-escuros; o I constricto perto do ápice e três vezes mais longo que o II; o III testáceo, duas e meia vezes mais longo que o IV; êste último, longo e escuro.

Rostro quasi alcançando a lâmina rostral, sendo esta alta e esbranquiçada.

Élitros longos, mais ou menos fuscos; área costal larga, trazendo, um pouco em frente do meio, algumas nervuras escuras, formando uma estreita faixa, as aréolas dispostas em carreira irregulares e com seis carreiras na sua maior largura; subcostal triseriada, com nervuras correspondentes à discoidal, manchada de escuro; discoidal estreitada, curta, levemente excavada, a maioria das nervuras escuras.

Margens dos paranotos e carenas, cobertas com delicados pêlos.

Comprimento 5.50 mms.; largura, 3.00 mms.

*Gargaphia decoris* DRAKE é uma espécie extremamente próxima de *G. formosa* (STAL). Quem confronta as diagnoses de *G. decoris* DRAKE (Ann. Ent. Soc. Amer., XXIV, p. 514, 1931) e a descrição apresentada por DRAKE & POOR, para *G. formosa* (STAL) (Mem. Carn. Mus., XI, p. 310, 1937), não as diferencia.

Colhi uma longa série de *G. formosa* (STAL), em S. Paulo (Capital) e abundante material de *G. decoris* DRAKE, em Belo Horizonte (localidade típica); e tanto os exemplares de uma, como de outra espécie, são bastante variáveis e por vezes se confundem.

Não concordo com o que diz DRAKE na diagnose de *G. decoris* "Closely allied to *G. obliqua* (STAL), but..." *G. decoris* é espécie bastante afastada de *G. obliqua*, não havendo o menor termo de comparação entre ambas. E' esta a primeira vez que se menciona esta espécie, depois da descrição original.

### 23 — *Gargaphia brunfelsiae* MONTE

A espécie determinada por DRAKE (Rev. Ent., vol. 4, f. 4, p. 450, 1934), como *G. munda* (STAL) (um exemplar em minha coleção, Viçosa, M. Gerais, 14-IV-1933), não é *G. munda*, mas *G. brunfelsiae* MONTE. *Gargaphia munda* (STAL) difere de *G. brunfelsiae* MONTE pelos seguintes caracteres: mais longa e mais estreitada; vesícula menor; carena mediana mais baixa; paranoto mais estreito; o ápice da área discoidal não levantado; os élitros não estrangulados; e a subcostal mais baixa.

### 24 — *Gargaphia gracilenta* Drake

A presente espécie foi descrita segundo um único exemplar de Córdoba, Argentina, e dela só se conhecia o material típico. Recebi 5 exemplares colhidos pelo Dr. De Carlo, de Agua de Oro, Córdoba, janeiro 1940 (n.º 45.363, do Museo Argentino de Ciencias Naturales); 4 exemplares de Córdoba, Dept. de Calamuchita, "El Sauce", XII-1938, colhidos pelo Dr. M. J. Viana.

### 25 — *Corycera gibbosa* Monte

Muitos exemplares colhidos em Pitangueiras, S. Paulo, 30-VII-1940, pelo autor. *Corycera rhopalae* Drake & Poor é um sinônimo desta espécie. O material em que os autores se basearam para a descrição foi enviado por mim, tendo sido omittida esta indicação, assim como, ao tratar das espécies *Acysta myrocarpi* e *Pachycysta hambletoni* (Bull. Brookl. Ent. Soc., vol. 33, 1, pp. 3-5).

### 26 — *Corycera rocha-limai*, n. sp. (fig. 6)

Côr e marcas semelhantes a *C. separata* (D. & H.), sendo porém, espécie muito menor. Cabeça proeminente em cima, com cinco espinhos longos, especialmente os tres anteriores, que formam a projeção espinhosa saliente. Olhos pretos. Antenas curtas, mais ou menos peludas; o I segmento, escuro, e de duas vezes o comprimento do II; os II e III segmentos, totalmente claros, sendo o III duas vezes maior que o IV; o último com o ápice levemente escurecido.

Pronoto bastante rugoso, fortemente puncturado; tricarenado; as carenas bem distintas, mas não areoladas, as laterais um pouco convergentes na porção triangular; paranotos esbranquiçados e distintamente uniseriados.

Élitros escuros, salvo na parte da área costal. Área costal bem estreita em sua maior parte, totalmente uniseriada, as aréolas de mais da metade desta área, afinadas e separadas por nervuras escuras, na parte mais larga, três células um pouco maiores; subcostal na mór parte triseriada; discoidal regularmente excavada, bem levantada no ápice. Outros caracteres semelhantes á *C. separata* (D. & H.).

Comprimento 2.17 mms.; largura, 0.73 mms.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 3 parátipos, de Belo Horizonte, Minas Gerais, colhidos pelo autor, em 14-IV-1937. A disposição dos 3 espinhos anteriores; a área costal mais estreita e não biseriada em sua maior largura; as antenas mais curtas, distinguem esta espécie de *C. separata* (D. & H.). Como homenagem, a espécie é dedicada ao eminente cientista Prof. Rocha Lima.

### 27 — *Corythucha socia*, n. sp.

Pequeno, esbranquiçado, marcado de pardo escuro, semelhante a *C. fuscomaculata* (Stal). Antenas curtas, castanho-claras, ornadas com pêlos espinhosos

e longos. Corpo em baixo totalmente preto, inclusive a búcula. Rostro castanho claro com o ápice escuro, não alcançando o fim do sulco; a lâmina rostral com máculas amareladas. Patas amareladas.

Pronoto pouco elevado, castanho-claro, brilhante, com leve puncturação; porção triangular longa e delicadamente reticulada; carenas laterais não mui levantadas, areoladas, arqueadas em cima, alcançando mais ou menos a metade do pronoto; carena mediana não arqueada em cima, formando um ângulo agudo com forte declividade para a porção triangular, as aréolas largas. Vesícula relativamente estreita, mais comprida do que a carena mediana, estreitada na parte anterior, com as aréolas da parte superior totalmente enfuscadas e bem estranguladas perto do terço basal. Paranoto largo; o comprimento, do dôbro da largura, com 4 pequenas máculas pardacentas.

Élitros distintamente estreitados na parte posterior e mais alargados junto á base; elevação túmida, moderadamente elevada; a área costal triseriada, as células da base dispostas irregularmente, com duas faixas escuras, uma junto á base e outra estreitada, ocupando somente uma carreira de aréolas e em sentido oblíquo, dirigindo-se para o ápice dos élitros.

Vesícula, carenas, margens dos élitros e paranotos, armados com espinhos claros e de extremidades pretas.

Comprimento 2.82 mms.; largura, 1.56 mms.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 16 parátipos, colhidos pelo autor, em 17-IV-1938, junto á gruta da Lapinha (Lagôa Santa), sôbre uma euforbiácea. Parátipos na coleção do Instituto Biológico.

A espécie é um tanto próxima de *C. fuscomaculata* (STAL); entretanto o seu menor tamanho, aspecto geral, distribuição das máculas, vesícula menor e mais estreitada, carena mediana mais baixa e diferentemente formada, élitros mais estreitados atraz e não paralelos, fazem-na distinguir de *C. fuscomaculata* (STAL).

### 28 — *Corythucha argentinensis*, n. sp.

Vesícula medianamente desenvolvida, um pouco mais longa do que alta, bastante estrangulada na sua metade, a porção anterior estreita e a posterior levemente globosa; a parte globosa manchada de escuro.

Pronoto liso, brilhante, pálido, muito pouco elevado; paranoto sinuoso, com as margens externas levemente dobradas para baixo, largo, com uma mancha escura, mas um tanto desmaiada; as margens externas armadas de uma dupla carreira de espinhos claros, com a extremidade escurecida; carena mediana bem elevada, quasi da altura da vesícula, com uma mancha escura e larga na parte central e superior, e aí biseriada, e na base duas grandes células vitreas. Na carena mediana encontram-se pequenos espinhos, na parte lateral, mas não sôbre a margem externa.

Antenas amareladas, cobertas de pêlos esparsos e amarelo-pálidos.

Élitros com a margem externa quasi reta, mas visivelmente curvados para baixo; a área costal quasi totalmente biseriada, mas triseriada na sua maior largura, levemente maculada, e com os dois terços anteriores marginados por pequenos espinhos. A elevação da discoidal pouco desenvolvida.

Colorido geral amarelo-pálido, com máculas pardacentas sôbre o paranoto, área costal e elevação túmida.

Comprimento 2.50 mms.; largura, 1.50 mms.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 4 parátipos de Resistencia, Argentina, em XI-1935, colhidos pelo DR. PEDRO DENIER.

A ausência das carenas laterais aproxima esta espécie de *C. pellucida* D. & H., mas a vesícula diferentemente formada, a carena mediana quasi da mesma altura da vesícula, a área costal mais estreita e diferentemente marcada, separam-nas.

## 29 — *Teleonemia simulans* DRAKE

Quatorze exemplares de Córdoba, Dept. de Calamuchita, "El Sauce", Argentina, XII-1939, colhidos pelo DR. M. J. VIANA; 1 exemplar de Col. Benitez, Argentina, DR. PEDRO DENIER, leg.

## 30 — *Teleonemia multimaculata*, n. sp.

Pouco alongada. Castanha, com os élitros manchados de escuro; a área costal marcada por pontos negros. Cabeça com 5 espinhos testáceos; o par anterior e o espinho mediano muito curtos e unidos em um só bloco; o par posterior bem mais longo e descançando na superfície da cabeça. Antenas curtas, grossas, castanhas e relativamente peludas. Os segmentos I e II quasi do mesmo comprimento; o III duas vezes maior que o IV; êste, um pouco menor que o I e II juntos.

Búcula bem desenvolvida e amarelada. Abertura rostral apertada, profunda e quasi escondendo o rostro, e bastante rasa na parte alargada; rostro curto, escurecido para o ápice.

Pronoto bastante convexo, puncturado, castanho escuro; tricarenado, mas as carenas levemente distintas, apertando-se as laterais para a porção triangular. Vesícula ausente; colo bem largo; paranoto indistinto, semelhante ás carenas.

Élitros arredondados, levemente apertados para a parte posterior, com aréolas infuscadas; a área costal bem estreita na parte anterior, indistintamente areolada nesta parte, mas nitidamente uniseriada na posterior; todas as células divididas por nervuras grossas e negras; subcostal estreita, uniseriada atraz; discoidal larga.

Comprimento, 3.90 mms.; largura, 1.30 mms.

Holótipo (fêmea) e um parátipo, Fazenda do Bosque, Cordeiro, Limeira, S. Paulo, 16-IV-1940, colhidos em uma trepadeira, pelo autor.

Esta espécie é muito próxima de *T. nigrina* CHAMPION, no aspecto geral, côr e marcas da área costal, mas dela facilmente se separa pelas antenas maiores, área costal muito mais estreita e pelo maior tamanho.

## 31 — *Teleonemia albomarginata* CHAMPION

DRAKE & HAMBLETON em Arq. Inst. Biologico, vol. 9, p. 52, 1938, sem apresentar razões, colocaram *T. albomarginata* CHAMPION na sino-

nímia de *T. lanceolata* (Walker). Sómente pela fotografia da Est. 9. B — fui capaz de saber dessa substituição, que é a meu ver uma base bastante frágil para discussão sistemática. Se não fossem os dois exemplares depositados nas coleções do Instituto Biologico, não me seria possível fazer êstes comentários. A descrição de Walker não esclarece o assunto e embora nela existam caracteres que podem coincidir com os de *Teleonemia albomarginata,* não são êles capazes de decidir da sinonímia. Outra circunstância que me leva a considerar *T. albomarginata* como bôa espécie, até que sejam apresentados elementos contrários e convincentes, é a de não ter Drake considerado nos seus estudos, duas de suas espécies, *Teleonemia spectabilis* e *Teleonemia dispersa* (Ann. Mag. Nat. Hist., vol. 8, n. 45, 1931, pp. 226-227) que são extremamente próximas de *T. albomarginata.* Drake assim se expressa sôbre elas: "On account of the characters of the paranota, carinae, and costal area in *T. dispersa,* and the structure of the paranota and carinae in *T. spectabilis,* it seems advisable to regard these two forms as distinct species rather than varieties of *T. albomarginata* Champion".

Distant em Ann. Mag. Nat. Hist., vol. IX, ser. 7, 1902, p. 357, tratando das espécies de Walker cujos tipos foram estudados por êle, coloca *Monanthia lanceolata* na secção: "To be trated as non-existent" — e mais abaixo diz: "Species the types of which are not be found in the British Museum", e nela inclue a espécie acima citada.

Estando perdido o tipo e não apresentando Drake elementos convincentes para justificar a sinonímia, *Teleonemia albomarginata* Champion deve ser considerada como bôa espécie.

### 32 — *Dicysta fonsecai,* n. sp.

Mais longa do que larga, transparente, com a porção entumecida da carena mediana totalmente escura, salvo uma célula que se encontra na base; uma faixa escura transversal no terço anterior da área costal e outra do mesmo colorido, obliqua, no ápice. Margens dos paranotos e élitros com minúsculos espinhos.

Cabeça sem espinhos, totalmente escondida pela vesícula. Lâmina rostral amarelada; rostro alcançando a base do abdómen. Antenas estreitas, moderadamente longas, totalmente pálidas, cobertas de pêlos, especialmente o IV segmento. O I segmento, longo, três vezes maior que o II; o III uma vez e meia maior que o IV.

Vesícula semelhante ás do gênero *Corythucha* (como em *D. brasiliensis*), medianamente desenvolvida atraz, a parte anterior bem constricta, com algumas nervuras escuras.

Pronoto pouco elevado, levemente puncturado, pálido testáceo; paranotos regularmente desenvolvidos, bem levantados, triseriados, em forma de concha, mas distintamente abertos. Carena mediana com a porção entumecida quasi tão alta quanto a vesícula, todavia bem mais estreita, com as células totalmente negras; o espaço entre esta porção e a vesícula, é dividido em duas grandes células.

Élitros muito estreitados na base e alargados para o ápice; a área costal na maior parte triseriada, com 4 carreiras de aréolas na sua maior largura, com aréolas espaçosas; no terço anterior uma faixa transversal escura, formada por aréolas e nervuras; a subcostal uniseriada a princípio, depois biseriada, formando uma pequena elevação; a sutural traz em sentido obliquo uma faixa escura, que corre numa excavação formada por uma carreira de células. Na margem interna as aréolas são escuras, formando uma mancha.

Patas amareladas. Parte inferior do corpo castanho-clara.

Comprimento 2.93 mms.; largura, 1.74 mms.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e oito parátipos, colhidos pelo autor em Guarujá, Santos, S. Paulo, em 6-X-1940, numa excursão em companhia, com J. PINTO DA FONSECA.

Próxima de *D. brasiliensis* DRAKE, mas distinguindo-se dela pelas faixas escuras, formato do paranoto, vesícula menor, margens dos élitros e paranotos serreados.

A espécie é dedicada ao colega e amigo J. PINTO DA FONSECA, do Instituto Biológico de S. Paulo.

## 33 — *Pachycysta diaphana* CHAMPION

Um exemplar de Pitangueiras, S. Paulo, 30-VII-1940. Esta belissima espécie não tinha sido encontrada depois que CHAMPION a descreveu (Trans. Ent. Soc. London, 1898, p. 59, pl. II, fgs. 6 e 6a.), do Amazonas, sendo esta a segunda citação que dela se faz na literatura.

## 34 — *Acanthotingis apicicornis* MONTE

Na descrição original desta espécie publicada em Papeis Avulsos do Departamento de Zoologia do Estado de S. Paulo, vol. I, pp. 13-16, 1940, não foram feitas referências ás suas medidas que apresentamos em seguida: comprimento 2.50 mms.; largura 0.84 mms.

## NEW AND LITTLE KNOWN TINGITIDAE FROM THE AMERICAN FAUNA

(Hemiptera - Tingitidae)

### *Abstract*

*In the present paper twelve species are described as new. Notes are also included on a few other species. Acanthocheila exquisita* UHLER *is redescribed and Teleonemia albomarginata* CHAMPION *considered as a valid species.*

———o———

# NOTAS SÔBRE "GARGAPHIA SUBPILOSA BERG"

## (Hemiptera - Tingitidae)

POR

Oscar Monte

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

O presente trabalho foi escrito com o fim de esclarecer a situação sistemática de *Gargaphia subpilosa* BERG, redescrevendo-a, visto haver grandes divergências entre os espécimens que foram considerados por CARL DRAKE e M. E. POOR, como "holótipo" e "alótipo" e a diagnose publicada por CARLOS BERG.

O estudo teve como ínicio o exame de um exemplar, determinado por DRAKE como *subpilosa*, que se acha em minha coleção, o qual por sua vez foi comparado com os dois exemplares etiquetados por BERG, depositados no Museo de La Plata. Esta comparação é devida à gentilesa do Prof. JOSÉ A. DE CARLO, do Museo de Ciencias Naturales de Buenos Aires, a quem sou fundamente grato pelo grande auxílio prestado, sem o que não poderia fazer as presentes notas. A redescrição de *subpilosa* poderá, creio eu, ser útil aos futuros estudantes de tingitídeos, evitando-lhes incorrer em erros, nos quais incorreram vários entomologistas e eu; e tanto mais necessária ela se faz porque o próprio autor depositou exemplares de duas espécies no Museo de La Plata e no Museo de Ciencias Naturales, ambos na Argentina, como sendo *subpilosa*. Além do mais, estas notas procuram esclarecer o fato de ter uma determinação errada, que se verifica com relação a uma espécie de *Gargaphia*, existente, como acima ficou dito, em museus argentinos, creando uma nova espécie e estabelecendo o tipo de *Gargaphia subpilosa*.

Resulta dos estudos feitos no material um interessante caso de homonimia ou seja duas espécies diferentes com nomes iguais.

Deixo aqui assinalados os meus agradecimentos aos srs. Dr. CARL DRAKE (Ames, Iowa, U. S. A.), Prof. JOSÉ A. DE CARLO, JUAN M. BOSQ, JUAN B. DAGUERRE e M. J. VIANA, todos de Buenos Aires, pela gentilesa com que me auxiliaram nestes estudos, e a Senhorita Ruth de Carvalho pelo magnifico desenho.

### DIAGNOSE DA ESPÉCIE

Entre as espécies de tingitídeos descritas pelo notável hemipterologista argentino CARLOS BERG, uma existe que necessita ser redescrita, dada a confusão existente nas coleções, e principalmente porque o espé-

cimen considerado como *Gargaphia subpilosa* pelo Prof. CARL J. DRAKE não está de acôrdo com a diagnose publicada por BERG, em Hemiptera Argentina, 1879, pp. 136-137:

"*Gargaphia* STAL

*Monanthia*, Subg. *Gargaphia* STAL, Stett. Ent. Zeit., XXIII, p. 324 (1862)

*Gargaphia* STAL, Enum. Hem., III, pp. 119 et 124 (1873)

169 — *G. subpilosa*, nov. spec.

♂ et ♀ Nigri aut laete fusci, supra sparsim albicanti-pilosi; antennis, articulo quarto etiam interdum duobus basalibus exceptis, pedibusque testaceo albidis; bucculo, carinis, vesicula parteque postica pronoti nec non rete membranae marginalis pronoti hemelytrorumque albicantibus vel sordide albidis; capite fusco, ad partem albido-leproso, spinis tribus longis flavescenti-albidis instructo; articulo primo antennarum sat longo, secundo brevissimo, duobus interdum dilute, fuscis, quarto primo longiore, fusco, basi flavescenti, omnibus pilosis; pronoto fusco, albido-leproso, carinis vesiculaque sat pilosis, hac subcompressa, antrorsum vix producta rete marginali valde elevato, pone medium angulo excelso praedito et ibidem quadriseriato; membrana costae hemelytrorum basi angusta, subtilissime rotundata, basi ipsa unicellulata, deinde biseriata, tum triseriata et posterius quadriseriata; venis tribus aut quattuor, rarissime tantum duabus, transversis membranae costae obscure fuscis, venis posterioribus retis ad partem fuscescentibus; ventre tenuissime vix sericeo; pedibus pilosulis. Long. corp. 2 1/2, cum hemel. 3 1/2 lat. pron. 1 1/5, hemel. fere 2 mm.

Patria: Republica Argentina.

Es muy parecida á la *Gargaphia trichoptera y Gargaphia nigrinervis* STAL, que son originarias de Nueva Granada; y no la hubiera podido distinguir de las mismas, sin las indicaciones de STAL, á quien habia enviado dos ejemplares.

Se distingue de la *Gargaphia trichoptera* STAL, por la menor cantidad de pelos, principalmente en la parte inferior del cuerpo; por el ángulo muy alto de la membrana lateral del pronoto, y por su menor tamaño.

Difiere de la *Gargaphia nigrinervis* STAL, por los pelos que llevan los hemélitros; por los pelos escassos y muy cortos en el vientre, y por el ángulo mas elevado de la membrana lateral del pronoto.

Los ocho ejemplares que poseo, fueron recogidos en Buenos Aires y en el Baradero; en el primer lugar observé esta especie en la *Mikania auricularia* GBR".

## MATERIAL EXAMINADO

O autor deve o grande número de exemplares que serviram aos seus estudos à gentilesa dos entomologistas argentinos, srs. JUAN M. BOSQ, JUAN B. DAGUERRE e MANUEL J. VIANA. Dos 65 exemplares recebidos, e um a um examinados, sómente dois apresentaram a área costal triseriada, porém, sómente de um lado; todos os outros tinham a área costal totalmente biseriada.

IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Pela impossibilidade de um estudo no material de La Plata, tive que apelar para o Dr. CARL DRAKE, visto ter êste especialista estudado a coleção BERG. Do lote que me foi enviado da Argentina, destaquei exemplares que foram remetidos a DRAKE. Êste autor determinou o material como *G. subpilosa* BERG, e confirmou esta determinação enviando-me um outro exemplar de sua coleção; além disso, possuo por troca com o Un. St. National Museum, um espécimen, que também foi determinado pelo Prof. DRAKE. Êste material foi enviado ao Prof. DE CARLO, para comparação com os exemplares depositados no Museo de La Plata, e os resultados foram-me comunicados pelo Prof. DE CARLO nas seguintes linhas:

"Apreciado Amigo Dr. Oscar Monte — Me es muy grato comunicarle que recebi su atenta carta de fecha 11 de Julio y la cajita con los ejemplares de *Gargaphia subpilosa* BERG para comparar con el ejemplar visto por el Dr. DRAKE en el Museo de La Plata.

Con el mayor agrado he satisfecho su deseo y el dia 25 del corriente mes, fui a La Plata e hice la comparación.

Doy a Ud. toda la información que considero necesaria:

Los ejemplares que examiné en el Museo de La Plata son los mismos que vió el Dr. DRAKE (no es un solo ejemplar, sino dos pegados en una misma etiqueta). El Dr. DRAKE ha colocado debajo de los ejemplares una etiqueta que dice "Holotype". Esos ejemplares tienen como procedencia, Baradero, es decir que son dos de los ocho ejemplares que dice que poseía, al final de la descripción de la especie (Hemiptera Argentina, p. 137). En esos ejemplares no está la etiqueta "Typus" que BERG solía poner a sus nuevas especies.

Los ejemplares que Ud. me mandó determinados por el Dr. DRAKE, son iguales a la especie de BERG que existe en el Museo de la Plata. Me he fijado muy bien al compararlos y sobre todo he visto con detención las células de los costados de las alas; empiezam con una célula y luego siguen siempre dos, formando dos hileras longitudinales. Este detalle de las células, como Ud. bien lo observa, no concuerda con lo que dice la descripción de BERG, "membrana costae hemelytrorum basi angusta, subtilissime rotundata, basi ipsa unicellulata, deinde biseriata tum triseriata et posterius quadriseriata".

Ahora, lo curioso es que el ejemplar que yo le mandé del Museo de Buenos Aires, responde según Ud., a la descripción que da BERG, lo que hace pensar en cual será el verdadero ejemplar que debe considerar-se como tipo, si el de La Plata o el del Museo de Buenos Aires.

Por mi parte no opino nada al respecto, solo me he concretado a proporcionarle todos los datos que he considerado necesarios.

*Nota* — Los ejemplares (dos en una etiqueta) del Museo de La Plata tienen la correspondiente etiqueta de BERG.

Estando a sus órdenes en lo que pueda serle útil, me es muy grato saludarlo con mis expresiones de mayor respeto y consideración. (Ass.) JOSÉ A. DE CARLO".

COMENTÁRIOS

DRAKE em 1931 (Ann. Ent. Soc. Amer., vl. XXIV, p. 512) evidencia a dificuldade que teve em determinar a espécie *G. subpilosa* pela diagnose, exprimindo-se desta maneira: "A photograph of BERG's type enables the writer to determine this species".

Já nesta linha ressalta um fato muito interessante: o de DRAKE considerar tipo o exemplar representado na fotografia, e entretanto em 1939 etiquetar outro material como tipo.

O autor destas Notas, em 1938 (An. Soc. Cient. Arg., CXXVI, pp. 387-388 e 389-390), fez comentários sôbre a má posição na sistemática desta espécie e classificou errôneamente como *iridescens* CHAMPION os espécimens que lhe foram enviados da Argentina, dado que, os comentários de BERGROTH (Ann. Soc. Ent. Belg., 52 1922, pp. 149-150) concordavam com o material examinado. Parece-nos que o material estudado por BERGROTH deve ter sido idêntico ao que examinamos, pois já explanamos *op. cit,* o que pensávamos do assunto.

Posteriormente recebemos material de *G. iridescens* CH. (U. S. Nat. Mus., em troca), e verificamos o erro em que incorremos, daí a necessidade de esclarecer a posição sistemática do material que possuíamos e daquele que provavelmente foi estudado por BERGROTH, corrigido a área de dispersão de *Gargaphia iridescens* CHAMPION.

Comparando-se o material verifica-se que *G. iridescens* CHAMPION distingue-se perfeitamente de *G. bergi,* n. sp., por ser de menor tamanho; o pronoto muito mais estreito e não anguloso como em *bergi;* as aréolas da área costal muito mais estreitas; a discoidal menos larga.

Posteriormente DRAKE & POOR estudaram os tingitídeos da coleção CARLOS BERG, guardada no Museo de La Plata (Notas del Museo de La Plata, t. III, Zool. n.º 10, p. 109). Ao tratar desta espécie, não sei por que razão os autores não se referiram às divergências existentes entre os exemplares que consideraram como tipo, e a diagnose de BERG, para esclarecer o assunto. Ao referirem-se a *subpilosa,* os autores consideram estudados os holótipo e alótipo (rotulagem feita por DRAKE & POOR), quando os exemplares alí depositados não se acham rotulados como tais por BERG. O único elemento que nos pode levar a julgá-los como tipo é trazerem êles a procedência de Baradero; mas BERG não afirma que o tipo é de Baradero e sim que "los ocho ejemplares que poseo, fueron recogidos en Buenos Aires y en el Baradero". Podemos concluir pelo que se lê, que o tipo também pode ter sido proveniente de Buenos Aires.

BERG costumava colocar a etiqueta "typus" em seus espécimens; os exemplares estudados por DRAKE & POOR e que estão em La Plata, não possuem essa etiqueta. Há um exemplar depositado no Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", de Buenos Aires, sob o n.º 5653, que foi determinado e etiquetado por BERG, como *Gargaphia subpilosa*, e que difere totalmente dos exemplares considerados por DRAKE & POOR como tipo a meu ver concordando perfeitamente com a diagnose de BERG. Êste exemplar foi-me cavalheirescamente cedido pelo Prof. DE CARLO, para estudos. O espécimen 5653 está um pouco estragado, sem um dos élitros, mas pode-se estudar com segurança.

DRAKE e POOR etiquetaram os exemplares de La Plata como "holotype", escolhendo como tipo de *Gargaphia subpilosa* os dois exemplares colados no mesmo cartão, os quais discordam totalmente da diagnose de BERG.

Êste autor, descrevendo sua espécie, dá os seguintes caracteres, que servirão aos nossos comentários: *"spinis tribus longis flavescenti-albidis instructo"; "rete marginali valde elevato, pone medium angulo excelso praedito et ibidem quadriseriato"; "membrana costae hemelytrorum basi angusta, subtilissime rotundata, basi ipsa unicellulata, deinde biseriata, tum triseriata et posterius quadriseriata".*

Com êstes elementos poderemos discutir a espécie, considerada por DRAKE & POOR, como "holotype".

Dos 65 exemplares em meu poder, nenhum apresenta as características acima descritas, porque não possuem espinhos longos e erectos; o paranoto não é quadriseriado na sua maior largura; a área costal não é quadriseriada, e sim totalmente biseriada, salvo em dois exemplares e assim mesmo sómente de um lado possuem três carreiras de aréolas.

BERG aproximou sua espécie de *Gargaphia trichoptera* STAL e *Gargaphia nigrinervis* STAL. Os exemplares considerados por DRAKE & POOR como *Gargaphia subpilosa* BERG não são próximos de *trichoptera* e *nigrinervis*, e sim de *opacula* UHLER e *iridescens* CHAMPION.

Nos seus comentários refere-se BERG às diferenças entre sua espécie e *trichoptera:* "por el ángulo muy alto de la membrana lateral del pronoto". E' um absurdo considerar o paranoto de *trichoptera* menor do que o dos exemplares depositados em La Plata. O paranoto dos exemplares considerados por DRAKE & POOR, como *subpilosa* é bastante estreito.

O exemplar 5653, sendo a meu ver uma espécie mui próxima de *G. concursa* DRAKE, é mais aliada à *G. trichoptera* e concorda com os comentários que fez BERG. Aliás DRAKE & POOR (Notas del Museo de

La Plata, t. III, Zool. n.º 10, p. 109) discordam dos dizeres de BERG, pois textualmente se expressam: "y facilmente separable de sus aliadas por su paranoto anguloso, más bien estrecho".

Diante do exposto designamos como tipo de *Gargaphia subpilosa* BERG, o exemplar depositado no Museo de Ciencias Naturales, de Buenos Aires, sob o n.º 5653.

* * *

## REDESCRIÇÃO DE *Gargaphia subpilosa* BERG, 1879

Alongada, moderadamente larga, testácea. Cabeça castanha, com cinco espinhos um tanto longos, erectos, sendo o mediano o maior deles; o par anterior, curto, e o posterior, quasi do mesmo comprimento do mediano e levemente dirigidos para fora. Antenas longas, testáceas, pilosas; somente o último segmento escuro, com a base amarelada. O I segmento duas vêses e meia maior do que o II; o III mais de três vêses maior do que o IV; êste igual aos dois primeiros juntos.

Pronoto escuro, um tanto elevado, com exudação esbranquiçada, tricarenado e a porção posterior clara e reticulada. As carenas altas e distintamente unisseriadas e as laterais paralelas. Vesícula testácea, bem desenvolvida, um tanto comprimida e não lançada sôbre a cabeça; paranoto largo, fortemente levantado, anguloso, tricarenado na sua maioria e quadriseriado na sua maior largura.

Élitros largos com a área costal larga, uni, bi, depois tri e finalmente quadriseriada na parte mais larga, com três nervuras escuras e transversais, margens levemente serreadas; subcostal biseriada, com algumas nervuras, formando uma leve mancha; discoidal larga, um tanto excavada, com uma leve mancha castanha no ápice, com 4-5 aréolas na sua parte mais larga; a nervura que limita as áreas subcostal e discoidal, em parte escura.

Patas amareladas; tarsos escuros.

Comp. 3,75 mms.; largura 2,00 (medindo um 1,00 para o único élitro existente.

Tipo, um exemplar depositado no Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", em Buenos Aires, sob o n.º 5653, e rotulado por BERG como *Gargaphia subpilosa*, sem procedência. O exemplar tem um só élitro e uma só antena, e como está colado sôbre um cartão, não se pode distinguir o sexo.

## *Gargaphia bergi*, n. sp.

Fig. 1

Pequena, um tanto achatada, tendo a cabeça com cinco espinhos, mais ou menos longos, testáceos; o par anterior quasi do tamanho do mediano e êste um tanto erecto; o par posterior dirigido para a frente. Antenas moderadamente longas; os I e II segmentos, escuros; o III, testáceo e peludo; o IV, escuro com abundantes pêlos. O I o dôbro do II; o III duas vêses o comprimento do IV.

Pronoto levantado, escuro, com a porção triangular reticulada e clara; tricarenado, as carenas um tanto levantadas, uniseriadas e as laterais constrictas

além do meio. Vesícula bem desenvolvida, um pouco comprimida no meio e não lançada sôbre a cabeça. Paranoto estreito, anguloso, na maioria biseriado e com três carreiras de aréolas na parte mais larga, e não reflexo.

Élitros estreitos, com área costal totalmente biseriada (salvo em dois exemplares, que possuem três carreiras de aréolas, somente de um lado), possuindo 3-4 nervuras escuras transversais; subcostal biseriada; discoidal um tanto larga, trazendo uma mancha alongada e escura sôbre a nervura que limita esta área com a subcostal.

Comp., 3,25 mms.; largura 1,50 mms.




Fig. 1 — *Gargaphia bergi,* n. sp.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 63 parátipos em minha coleção, todos da Prov. de Buenos Aires, Argentina. J. M. Bosq, J. B. Daguerre e M. J. Viana, leg.

A espécie é muito próxima de *iridescens* Champion, da qual se distingue fácilmente pelo seu maior tamanho; pelas nervuras sôbre a área costal; e pelos outros caracteres anteriormente assinalados.

O nome da espécie é uma homenagem ao Dr. Carlos Berg.

*Nota* — Êste trabalho já tinha entrado em segunda prova, quando recebi por gentilesa do Dr. Max Birabén, Jefe del Departamento de Zoología, do Museu de La Plata, dois tingitideos colados em cartão. Traziam os seguintes rótulos: um esbranquiçado, tarjado de vermelho, onde se acha impresso "Typus" (em tinta encarnada); um segundo, verde, onde se lê: Buenos Aires; e um terceiro, branco, marginado de verde, com a inscrição: "Gargaphia subpilosa Berg". No entretanto, os exemplares colados pertencem á espécie *Corythaica cyathicollis* (Costa).

Se êste material não houvesse sido por mim agora examinado, maior seria a confusão sôbre esta espécie. Nada há a modificar, pois, nos esclarecimentos acima explanados.

Expresso os meus agradecimentos ao Dr. Birabén por me ter permitido estudar o material da coleção Berg e uma vez mais ao Sr. J. M. Bosq, pela sua intervenção junto á direção do Museu de La Plata.

NOTES ON "GARGAPHIA SUBPILOSA Berg"

(HEMIPTERA-TINGITIDAE)

*Abstract*

*In this paper Gargaphia bergi, n. sp. is described and Gargaphia subpilosa* Berg *is redescribed. The Author designated the type of G. subpilosa* Berg.

———o———

# ÜBER DIE ZEREBRALEN KRANKHEITSERSCHEINUNGEN BEIM FLECKFIEBER

VON

Prof. Dr. Fritz Munk, Berlin

Die Erinnerung an die gemeinsame Forschungsarbeit mit dem Jubilar und Freunde Herrn Professor Dr. ROCHA LIMA, die uns während des grossen Krieges von 1916-1918 bei unseren Studien über die Aetiologie und Klinik des Fleckfiebers in Polen zusammenführte und die dann i. J. 1922 in einer gemeinsamen Expedition in Brasilien zur Erforschung der Chagaskrankheit eine schöne und denkwürdige Fortsetzung fand, gibt mir Veranlassung das obige Thema zu seiner Festschrift zu wählen.

Die klinischen Abhandlungen, die vor dem Krieg über das Fleckfieber vorlagen, stammten in der Hauptsache von ausländischen, namentlich russischen und polnischen Autoren. In Deutschland hatte GRIESINGER als Erster das klinische Krankheitsbild des "Flecktyphus", wie diese Krankheit seit der durch PETIT und SERRES erfolgten Entdeckung der Veränderung der Unterleibsorgane beim "Abdominaltyphus" zum Unterschied von diesem genannt wurde, festgelegt. Es folgten dann kurze Berichte über Beobachtungen von NIEMEYER, WUNDERLICH und MOSLER. Zuletzt gab CURSCHMANN in einer Monographie über das Fleckfieber seine Beobachtungen bei einer noch im WINTER 1878/79 in Berlin beobachteten grösseren Epidemie bekannt. Nach vorhandenen Aufzeichnungen fanden allein in den preussischen Hospitälern von 1877-1882 noch mehr als 10000 Fleckfieberkranke Aufnahme. Erst in den letzten Jahrzehnten, mit der Hebung des allgemeinen Wohlstandes in Deutschland und der sich daraus ergebenden gebesserten Lebensweise des ganzen Volkes blieben Epidemien von Fleckfieber aus. So beschränkten sich die Erfahrungen der Kliniker in diesem Jahrhundert in Deutschland lediglich auf vereinzelte verschleppte Fälle in den östlichen Grenzgebieten.

Es ist bemerkenswert, dass in allen den genannten Abhandlungen die zerebralen Erscheinungen nur eine mehr oder weniger allgemeine Erwähnung finden, die in dem Begriff des typhösen Zustandes sowohl in psychischer, wie auch in körperlicher Hinsicht ihren Ausdruck und ihre Erklärung finden. In erster Linie wird das hohe Fieber für diesen Zustand verantwortlich gemacht. Auch in den bereits während des Krieges erschienenen Abhandlungen über das

Fleckfieber, z. B. in der Monographie von JUERGENS und in anderen Abhandlungen finden die Erscheinungen infolge von Störungen im Zentralnervensystem noch keine Würdigung. Es mag sein, dass einerseits die oft primitiven Umstände unter denen die klinische Behandlung der Fleckfieberkranken und ihre Beobachtung erfolgen konnte und andererseits auch die grosse Gefährlichkeit dieser Tätigkeit von unserer Kenntnis der Aetiologie und der Bedeutung der Kleiderlaus für die Übertragung eingehende klinische Untersuchungen und Beobachtungen verhindert haben. Nur dadurch erscheint es mir erklärlich, dass die verschiedenartigen, eindrucksvollen Erscheinungskomplexe, die jeweils als ganz bestimmte Ausfallserscheinungen, verursacht durch bestimmte örtliche zerebrale Störungen im Verlaufe der Krankheit so häufig auftreten, bis dahin so wenig Beobachtung gefunden haben.

Meine Studien bei einer etwa 200 Krankheitsfälle umfassenden Epidemie in Brest-Litowsk (s. Zeitschrift für klinische Medizin Bd. 82) liessen mich alsbald erkennen, dass die psychischen und nervösen Krankheitssymptome beim Fleckfieber in allen Fällen einen besonderen Charakter aufweisen und sich auch von vorneherein von ähnlichen sogenannten typhösen Zuständen bei anderen hochfieberhaften Infektionskrankheiten, namentlich auch von denen beim Abdominaltyphus grundsätzlich unterscheiden. Wenn auch die eigentümliche Entwicklung der Erscheinung nur in den schwereren Fällen durch unverkennbare Ausfallserscheinungen seitens des Zentralnervensystems zum Ausdruck kommt, so zeigen sich auch in den leichteren Fällen Merkmale, die als Vorstufen der schweren Zustände doch eine bestimmte Richtung, ein charakteristisches Bild ausmachen. Bereits das Prodromalstadium ist durch das Auftreten von Schwindelgefühl, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit, Muskelschmerzen u. s. w. gekennzeichnet. Mit dem Eintritt der Temperatursteigerung, oft unter Schüttelfrost setzt dann die Krankheit mit einem Schlage in der ganzen Schwere der subjektiven Beschwerden ein. Das Bewusstsein ist zwar in diesen ersten Fiebertagen meist noch nicht getrübt. Die Kranken sind über ihre Umgebung orientiert, aber die genannten Erscheinungen, namentlich der echte Schwindel bei jeder Bewegung veranlassen ein gegen die Umgebung abgekehrtes Verhalten und jede Bewegung, selbst jede geistige Anstrengung (Antworten) wird vermieden. So machen die Kranken oft schon in diesem Stadium der Krankheit den Eindruck der Benommenheit, der Kranke verhält sich ohne äussere Anregung vollkommen ruhig. Etwa die andere Hälfte der Kranken aber zeigt in den ersten Tagen eine gewisse Unruhe oder ist offensichtlich durch Wahnvorstellungen beherrscht. Letztere

äussern sich entweder nur in andauernd spontan geführten Gesprächen, in Kommandorufen, in lautem Schimpfen oder dergleichen. Sie können aber auch durch entsprechende Bewegungen oder Handlungen angezeigt sein. Sehr häufig wird dabei ein Bestreichen oder Bezupfen der Bettdecke beobachtet, ferner eigentümliche Abwehrbewegungen, ganz ähnlich wie beim Delirium tremens, mit dem dieser Zustand überhaupt grosse Ähnlichkeit hat. Ein Patient z. B. setzte sich im Bett auf, machte anhaltende Schwimmbewegungen, bis er jeweils wieder ermattet zurück sank. Das Verlassen des Bettes kommt in diesem Stadium nicht selten vor, jedoch setzt der allgemeine Schwächezustand und eine bereits hier erkennbare eigentümliche Bewegungshemmung anhaltenden gewalttätigen Unternehmungen doch bald gewisse Grenzen. Dieser Zustand hält in solcher Heftigkeit jedoch meist nur wenige Tage an und fällt in das Ende der ersten Fieberwoche. Oft wird er plötzlich abgebrochen und die Kranken liegen dann vollständig ruhig wie hingeschlagen in Bett. Eine gewisse Unorientiertheit mit ruhigen Delirien kann dabei noch eine Woche und noch länger nach der Entfieberung anhalten. Wenn man in dieser Zeit noch im Zweifel sein kann, ob diese Erscheinungen durch den Infekt als solchen, durch die Intoxikation bezw. durch den immunisatorischen Prozess und seine Folgen namentlich das Fieber, u. s. w., also durch den generellen Kampf des Organismus mit dem Krankheitserreger bedingt sein könnten,, so lassen die in allen schweren Fällen nunmehr hervortretenden Hauptmerkmale der nächsten Krankheitstage doch klar erkennen, dass es sich um Folgezustände bestimmter anatomischer Prozesse im Nervensystem ursächlich handelt.

Dies kommt schon in einer auffallend unbeweglichen Lage und Haltung der Kranken zum Ausdruck. Sie liegen vollkommen regungslos im Bett, halten den Blick oft stark nach einem Punkte gerichtet oder schlafen scheinbar mit halbgeöffneten Augen, sodass dieser Zustand eine gewisse Ähnlichkeit mit dem katatonischen Zustand bei *Dementia hebephrenica* aufweist. In dieser Ansicht wird man bestärkt, wenn man dem Wesen dieses Zustandes näher nachforscht. Es zeigt sich dann, dass die Bewegungslosigkeit keineswegs ihre Ursache allein in einer Erschöpfung hat, sondern offenbar ebenfalls durch bestimmte pathologische Veränderungen der Hirnfunktion bedingt ist. Spontane aktive Bewegungen werden möglichst vermieden. Werden solche durch äussere Anregungen hervorgerufen, so erfolgen sie sehr langsam und schwerfällig. Bei der Ausführung passiver Bewegungen bemerkt man eine deutliche Resistenz in der Muskulatur. Hebt man bei einem

Kranken in diesem Zustande den Arm hoch, so wird auch von sehr schwachen Kranken der hochgehobene Arm längere Zeit hindurch unbeweglich in der gegebenen Stellung gehalten, auch dann noch, wenn der Kranke nicht mehr beobachtet wird. Bringt man nach dieser Zeit den hochgehobenen Arm wieder zurück, so stellt sich dabei dieselbe Resistenz in der Muskulatur entgegen, wie bei jeder anderen Bewegung. Es handelt sich daher unzweifelhaft um eine ausgesprochene *Flexibilitas cerea,* die als ein eigentümliches Symptom der *Hebephrenie* gilt.

In diesem Zustand ist der Kranke häufig nicht vollkommen benommen, allerdings beschränkt sich die Art mit der er zu verstehen gibt, dass er Fragen oder Aufforderungen versteht, z. B. lediglich auf Zeichen, die er mit den Augen gibt, während er andere Bewegungen fast vollkommen unterlässt und sich selbst nicht einmal zur geringsten Wortäusserung bringen lässt, oder er macht eigenartige erzwungene Versuche, etwas herauszubringen. Diese eigenartige Sprachhemmung macht fast mehr den Eindruck eines *Mutismus* als einer *Aphrasie,* dürfte aber trotzdem durch die Muskelhemmung bedingt sein.

Andere Kranke lassen durch die Art der Sprache, die sich durch einen monotonen pastoralen Klang auszeichnet oder durch eine ausgesprochene *Persveration* den Vergleich mit der *Hebephrenie* noch zutreffender erscheinen. Einer meiner Patienten sang fast unausgesetzt 10 Tage lang während der Krankheit ein bekanntes Volkslied. Als er bereits entfiebert war und im übrigen ein normales Verhalten zeigte, brachte er noch etwa 6 Tage lang seine Wünsche und Äusserungen in der Melodie des Liedes vor.

In schweren Fällen tritt der Zustand eines ausgesprochenen *Komas* ein. Die Kranken reagieren auf keinerlei Ansprache, selbst auf gröbere Insulte (Nadelstiche) nur träge. Die Pupillen sind dann weit geöffnet, reagieren nur langsam und wenig ausgiebig auf Lichtwechsel.

Das Eintreten dieses Zustandes, ebenso wie vielleicht in etwas geringerem Grade das katatonische Verhalten muss als ein prognostisch sehr ungünstiges Symptom bewertet werden. Das Auftreten der Delirien im fieberhaften Zustand kann wohl auch als ein Zeichen der Schwere des Falles angesehen werden, insbesondere dann, wenn es längere Zeit anhält. Im allgemeinen jedoch, zumal bei kurzer Dauer deutet es noch keineswegs auf einen ungünstigen Verlauf der Krankheit hin. Nach Ablauf des Deliriums besteht meistens eine vollkommene *Amnesie,* für die tatsächlichen Ereignisse während dieser Zeit, aus der nur die Erinnerungsbilder einzelner besonders wirkungsvoller Augenblicke (Verleihen des

Eisernen Kreuzes, Besuch hoher Vorgesetzter u. s. w.) hervorleuchten. Andererseits stehen aber die Kranken auch nach wiedergekehrtem Bewusstsein doch noch längere Zeit unter dem mächtigen Eindruck der vorausgegangenen Wahnvorstellungen. Von den im Verlauf von Typhus abdominalis gelegentlich beobachteten Psychosen (paranoische Systempsychosen nach Art der Erschöpfungspsychosen) unterscheiden sich diese Zustände beim Fleckfieber nicht nur durch ihr frühzeitiges Auftreten, sondern auch durch ihren Charakter und ihre kürzere Dauer.

Nur in einem Falle eines erkrankten Kollegen überdauerte die Psychose, die sich in der Form einer schweren Coprophilie äusserte, den Ablauf der Krankheit und veranlasste die Überführung in eine psychiatrische Anstalt, wo sie dann nach einigen Wochen völlig abklang.

Die motorischen und funktionellen Störungen des Nervensystems, zu denen bereits der eingezogene Leib, die steife Körperhaltung, eine gewisse Schwerfälligkheit der Bewegungen, die herabgesetzte Beweglichkeit des Kopfes, sowie die häufig beobachtete angezogene Haltung der Beine zu zählen sind, zeigen sich auch weiterhin in einer Druckempfindlichkeit der Muskulatur, der Rippen und der Gelenke. Es sind dies alles Anzeichen einer gewissen Spannung, bzw. eines Reizzustandes der peripheren Nerven, der dem Kernig'schen Phänomen bei der Meningitis zu vergleichen ist. Die Sehnenreflexe sind in diesem Zustand meist gesteigert, die Hautreflexe vorhanden. In einer Anzahl der Fälle macht sich die Spannung der Muskulatur auch an den Muskeln des Gesichts geltend. Die Haut faltet sich in Runzeln, die dem Kranken einen ängstlichen, schwerleidenden Gesichtsausdruck verleihen. An der Zunge und den Mundmuskeln tritt oft spontan, sowie bei jeder Bewegung (Sprechen u. s. w.) starkes fibrilläres Zittern auf. Es stellt sich ein deutlicher *Trismus* ein und der Unterkiefer zeigt zeitweise, besonders im Schlummern auftretende eigenartige Bewegungen, die sich zu ausgiebigen krampfartigen klonischen Zuckungen steigern können.

In manchen Fällen lassen die motorischen Reizerscheinungen besonders deutlich den striären Charakter erkennen. Sie können sich auf ein leichtes Zittern der Hände beschränken oder aber zu den groben Zitterbewegungen führen, wie sie bei Paralysis agitans beobachtet werden. Die Zuckungen der Hände können dann selbst durch den Versuch eines Festhaltens nicht ganz unterdrückt werden. Mitunter haben sie einen tetanischen Charakter, man beobachtet das Auftreten der "Geburtshelferhand", das sogen. Trousseau'sche Phänomen. Die Kontrakturen finden sich mitunter auch nur an besonderen Muskelgruppen, z. B. in der

Bicepsmuskulatur, oder es kommt zu einer Spannung der Flektoren am Fuss und an den Zehengelenken. Es besteht deutlicher *Fussclonus*, während das Phänomen von Babinski nicht deutlich nachzuweisen ist.

In einzelnen Fällen kommt es vor, dass schon sehr frühzeitig derartig tonisch-clonische Zuckungen anfallsweise auftreten und 2 Kranke sah ich im Zustande eines epileptiformen Anfalles ad exitum kommen. Diese Anfälle haben mitunter den Typus einer Jackson'schen Epilepsie, man kann dabei eine gewisse Einseitigkeit beobachten, in dem besonders der Kopf nach der einen, meist nach der linken Seite etwas abgedreht wird.

Eine eigenartige Störung zeigt sich ferner an der Sphynkterinnervation. Die Patienten lassen sehr häufig nicht nur im Stadium der Bewusstseinstrübung sondern auch bei freiem Sensorium unter sich. Andererseits kann eine vorübergehende Urinretension mehrfaches Katheterisieren erforderlich machen. In diesem Zustand zeigen dann der Bauch- und Kremasterreflex nicht selten eine gewisse Trägkeit, dagegen habe ich einen Nystagmus nie beobachtet.

Die bereits erwähnte Sprachstörung ist keineswegs nur auf eine etwaige Trockenheit der Kehle oder auf äussere Veränderungen der Zunge zurückzuführen. Selbst die Stimme hat einen anderen gedämpften Klang. Die Worte sind verschwommen, so wie wenn der Patient mit angehaltener Zunge sprechen würde. Dies beruht offenbar auf einer Muskelhemmung, mit der auch die in diesem Zustande vorhandenen Schlingbeschwerden in ursächlichem Zusammenhange stehen. Eine der häufigsten Erscheinungen des Zentralnervensystems beobachtet man im Bereich des Labyrinths. Nicht allein wird von den Kranken überaus häufig über Schwindelgefühl geklagt, welches auf einem echten Vertigo beruht, sondern auch das Ohrensausen ist weit mehr als beim Abdominaltyphus eine der häufigsten frühzeitigen Beschwerden der Kranken. In einer beträchtlichen Zahl der Fälle kommt es schon in der 2. Krankheitswoche zu vorübergehender, mitunter ganz beträchtlicher Schwerhörigkeit, die bis in die dritte Krankheitswoche anhalten und sich auch späterhin noch in geringem Grade bemerkbar machen kann. Die Kranken äussern darüber ganz charakteristische Angaben, dass ihnen die Ohren verlegt seien, dass sich die Sprache anderer wie aus einem Zimmer kommend, anhöre, dass ihre eigene Sprache so klinge, als ob ein anderer spräche. Alle diese Erscheinungen kommen vor, ohne dass sich die Anzeichen einer Otitis nachweisen liessen, welche als solche nicht selten eine Komplikation des Flecktyphus bildet.

In einzelnen Fällen lassen sich auch vorübergehende Paraesthesien, besonders im Ulnarisgebiet, sowie an der Haut der Ober- und Unterschenkel nachweisen. Oder es kommt zu der vorübergehenden Lähmung eines Gliedes. In einem Falle trat eine ausgesprochene halbseitige Lähmung auf. Eine Blutung fand sich in diesem Falle bei der Obduktion im Gehirn nicht, sondern die Erscheinung war lediglich durch die dem Fleckfieber eigentümlichen Prozesse bedingt.

Das Nervensystem weist demnach einen Komplex von Erscheinungen auf, die in den ersten Tagen mit den bei allen schweren Infektionskrankheiten beobachteten Alterationen Ähnlichkeit haben, in der späteren Periode der Krankheit aber ohne Zweifel auf den histologisch festgestellten anatomischen Veränderungen beruhen und darum eine dem Fleckfieber mehr oder weniger deutliche Eigentümlichkeit zeigen. Dies geht soweit, dass ich auf Grund meiner klinischen Beobachtungen bereits Professor CEELEN, dem ich damals mein Material von Warschau nach Berlin übersandte und der an diesem Material zuerst die dem Fleckfieber eigentümlichen Gehirnveränderungen feststellen konnte, schon jeweils einen Hinweis geben konnte, an welcher Stelle des Gehirns in dem jeweiligen Falle die stärksten Veränderungen anzutreffen sind.

Diesen direkten Ausfallserscheinungen seitens des Nervensystems sind weitere Krankheitserscheinungen in erster Linie die von mir ebenfalls zuerst beobachtete auffallende Blutdrucksenkung sowie auch die Polyurie ursächlich gleich zu stellen. Maximale Blutdruckwerte von 60-80 mg Hg sind in schweren Fällen ein gewöhnliches Vorkommnis.

Wie ich in einigen Fällen mit der Sicherheit eines Experimentes feststellen konnte, ist die zentral bedingte Störung der peripheren Blutzirkulation die Ursache der beim Fleckfieber so häufig beobachteten Gangrän der Haut, des Unterhautgewebes oder sogar der Füsse. Bei der mangelhaften peripheren Blutzirkulation braucht nur eine weitere Beeinträchtigung etwa durch Abkühlung oder durch Druck der Falte eines Leinentuches oder selbst eines Knochens (z. B. Knie) auf die Weichteile hinzuzukommen, um an den entsprechenden Stellen Gangrän, Dekubitus, Hautnekrosen oder tiefgehende Mumifikationen der Haut zu bewirken. Die Erkenntnis dieser Pathogenese ermöglichte es erst durch eine konsequente Anwendung vorbeugender Massnahmen in der Lagerung und Warmhaltung der Kranken das Auftreten dieser Erscheinungen völlig zu verhindern. Angesichts dieser niedrigen Blutdruckwerte ist die gleichzeitig zu beobachtende mehr oder weniger

ausgesprochene P o l y u r i e um so erstaunlicher. Auch diese Erscheinung ist ohne Zweifel der Ausdruck eines anatomischen Prozesses in den entsprechenden Zentren.

In der L u m b a l f l ü s s i g k e i t, die sich bei der Punktion mitunter unter einem beträchtlichen Druck entleert, lassen sich weder cytologisch noch physikalisch-chemisch regelmässige Befunde erheben. In manchen Fällen fanden sich kleine Endothelpartikelchen, die einen leichten Bodensatz bildeten. Nach den pathologisch-anatomischen Untersuchungen von CEELEN handelt es sich auch im Gehirn genau wie an den Hautroseolen um p e r i a r t e r i e l l e Gefässknötchen, die von gelappt körnigen Leukozyten vorwiegend aber von lymphocytären und von adventitiellen Elementen stammenden Zellen gebildet wurden. Die gleichen Prozesse finden sich an den Arterien a l l e r Organe, bezw. über den ganzen Körper verbreitet. Sie sind eine Kombination von a l t e r a t i v e n, p r o d u k t i v e n u n d e x u d a t i v e n e n t z ü n d l i c h e n V o r g ä n g e n h e r v o r g e r u f e n d u r c h d e n K r a n k h e i t s e r r e g e r. Eine Praedilektionsstelle für diese Veränderungen ist neben der Haut das G e h i r n und insbesondere die *Medula oblongata.*

Nach meinen klinischen Beobachtungen bestehen direkte graduelle und zeitliche Beziehungen zwischen ihrer Entwicklung in der Haut und im Gehirn und damit naturgemäss auch in den Krankheitserscheinungen. Im Bereich der Knötchen kann eine schwere bis zum völligen Verfall führende S c h ä d i g u n g der G a n g l i e n z e l l e n und N e r v e n f a s e r n stattfinden. Die Gehirngefässveränderungen sind darum für den pathologischen Anatomen das wichtigste Merkmal für eine postmortale Diagnose des Fleckfiebers. Aber auch für den Kliniker sind die Erscheinungen und der Verlauf dieser Krankheit bis in die Rekonvaleszenz hinein nur im Hinblick auf diese, das Krankheitsbild beherrschende Vorgänge verständlich.

———o———

# ZUR FRAGE DER ZUGEHÖRIGKEIT DES LYMPHOGRANULOMA INGUINALE ERREGERS

VON

Prof. Dr. E. G. Nauck, Tropeninstitut, Hamburg

Mit Tafel 46

Die grundlegenden Arbeiten ROCHA LIMAS über die von ihm zu Ehren der an Flecktyphus verstorbenen Forscher RICKETTS und VON PROWAZEK als *Rickettsia prowazeki* bezeichneten Erreger des Flecktyphus führten zu der Aufstellung einer besonderen Gruppe von Infektionskrankheiten, die heute unter dem Begriff der "Rickettsiosen" zusammengefasst werden.

Unter Rickettsiosen versteht man endemische oder epidemische, meist durch das Auftreten von Exanthemen und durch besondere immunbiologische Reaktionen (WEIL-FELIX) charakterisierte Erkrankungen, die durch gewisse blutsaugende Arthropoden (Läuse, Flöhe, Zecken, Milben) übertragen und durch zu der Gruppe der Rickettsien gehörende Mikroorganismen hervorgerufen werden (das durch Läuse übertragene epidemische Fleckfieber, das Tabardillo-Fieber, das murine, in erster Linie durch Rattenflöhe verbreitete endemische Fleckfieber, die Gruppe der durch Zecken übertragenen Fieber, wie Rocky Mountain Spotted Fieber, fièvre boutonneuse, São Paulo Fieber, Tick-bite-Fieber in Süd-Afrika, das durch Milben übertragene Tsutsugamushi Fieber).

Die Rickettsien, die von ROCHA LIMA zuerst als besondere Gruppe von Mikroorganismen erkannt und beschrieben wurden, sind durch eine Reihe von Merkmalen charakterisiert, die sie von Bakterien und Protozoen trennen und gewisse verwandtschaftliche Beziehungen zu der Virusgruppe erkennen lassen. Es sind kleinste "bakterienähnliche" Organismen von Kokken- und Stäbchenform, die sich durch ein besonderes färberisches Verhalten auszeichnen und die sowohl im befallenen Organismus als im Überträger eine ausgesprochene Neigung zu intrazellulärer Entwicklung aufweisen. Der obligatorische Zellparasitismus, den die Rickettsien mit allen Virusarten gemein haben, erklärt es wohl auch, warum die Rickettsien auf gewöhnlichen Nährböden nicht zur Vermehrung gebracht werden können, während sie in Gewebekulturen, d. h. in Gegenwart lebender Zellen wachsen können. Die Besonderheiten der intrazellulären Entwicklung, das färberische Verhalten und die morphologischen Eigentümlichkeiten der

Rickettsien sind im Laufe der letzten Jahre das Objekt vielfacher Studien gewesen und die Beschäftigung mit dieser Erregergruppe hat — wie kürzlich von WEIGL mit Recht hervorgehoben wurde — dazu geführt, immer mehr verschiedene Krankheitskeime in den Kreis der Rickettsien mit einzubeziehen und die entsprechenden Krankheitsbilder als Rickettsiosen zu bezeichnen. Er schreibt: "Jetzt genügt es schon, dass ein Erreger klein ist, sich schwach färbt und nicht gleich auf jedem künstlichen Nährboden üppig wächst, um ihn sofort und ohne jede Verantwortung als Mitglied in die jetzt gewiss als sehr aristokratisch angesehene Familie der Rickettsien zu erheben und die durch ihn hervorgerufene Erkrankung als Rickettsiose zu stempeln".

Ausgehend von der Tatsache, dass die Bildung der sogenannten Trachomkörper gewisse Übereinstimmung mit der intrazellulären Rickettsienentwicklung aufweist und dass auch die Weil-Felix-Reaktion bei Trachomkranken in einem gewissen Prozentsatz positiv ausfällt, gelangte eine Reihe von Autoren (BUSACCA, CUÉNOD und NATAF, FOLEY und PARROT, POLEFF) zu der Auffassung, dass es sich beim Trachom um eine "lokale" Rickettsiose handelt. Rickettsienähnliche Bilder wurden von COLES in Conjunctivalzellen von Schafen in Süd-Afrika entdeckt, zu einer *Iridocyclitis* in Beziehung gebracht und als *Rickettsia conjunctivae* bezeichnet. Der Erreger des Trachoms wird neuerdings als *Rickettsia trachomae* BUSACCA oder *Rickettsia trachomatis* von PROWAZEK-HALBERSTAEDTER bezeichnet. CUÉNOD und NATAF erklärten auf Grund von Infektionsversuchen an Läusen die Identität des Trachomerregers mit der von WEIGL entdeckten *Rickettsia Rocha Limae.* Dem gegenüber gelangten WEIGL und REIS bei der Verimpfung von Trachommaterial auf normale Läuse zu durchweg negativem Ergebnis. WEIGL kommt zu dem Schluss, dass die *Rickettsia Rocha Limae* überhaupt keine Beziehung zum Trachom-Erreger besitzt (im Serum trachomkranker Menschen liessen sich auch bei positiver WEIL-FELIX-Reaktion keine Agglutinine gegen *R. Rocha Limae* nachweisen), dass die Angaben über die Identität des Trachom-Erregers mit der *Rickettsia Rocha Limae* irrig seien und auf einem "groben Fehler" bei der Durchführung der Läuseexperimente beruhen.

Auf Grund rein morphologischer Tatsachen wird neuerdings auch der Versuch gemacht, die Psittakose- und Lymphogranuloma-inguinale-Körperchen, welche ähnliche intracelluläre Entwicklungsbilder zeigen, den Rickettsien zuzuzählen (DONATIEN und LESTOQUARD, BRUMPT, CAMINOPETROS). Der Erreger der Psittakose wird als *Rickettsia psittaci* bezeichnet, BRUMPT schlägt in einer Arbeit über eine neue im Magen von *Culex fatigans* in Tonkin entdeckte als *Ixodi-symbiotes* n. g. benannte *Rickettsia* für die Erreger des *Lymphogranuloma*

*inguinale* die Bezeichnung *Miyagawanella lymphogranulomatosis* vor — allerdings unter Hinweis auf die Schwierigkeit einer Klassifizierung der von ROCHA LIMA begründeten Familie der Rickettsiiden. Er fährt dabei fort: "Il sera peut être possible un jour d'inclure parmi les rickettsia les germes indéterminés de la vaccine *(Cytorryctes vaccinae* GUARNIERI 1894) de la rage *(Neuroryctes hydrophobiae* CALKINS) ainsi que le *Borreliota* GOODPASTURE 1937, des varioles humaines et animales, du molluscum contagiosum et de diverses autres maladies à ultravirus".

Die angeführten Beispiele zeigen mit aller Deutlichkeit die Tendenz, die ursprüngliche Definition der Rickettsien als besondere Gruppe von Mikroorganismen zu verwischen und eine Anzahl von Erregern, die heute noch zu der Virusgruppe gerechnet werden, unter den Begriff der Rickettsien zu bringen. Die leitenden Gesichtspunkte sind dabei vorwiegend m o r p h o l o g i s c h e r Art unter weitgehender Vernachlässigung der b i o l o g i s c h e n Eigentümlichkeiten. Es muss zugegeben werden, dass unsere gegenwärtigen Kenntnisse nicht ausreichen, um in der Rickettsiengruppe zu klaren Einteilungen und Abgrenzungen zu gelangen. Es scheint mir aber verfrüht, gewisse gemeinsame Erscheinungsformen und Kennzeichen als ausreichend zu betrachten, um die Gruppe der Rickettsien in einer überflüssigen und verwirrenden Weise zu erweitern.

Wir haben im Laufe der letzten Jahre nicht nur Gelegenheit gehabt, die von MIYAGAWA und Mitarbeitern zuerst bei *Lymphogranuloma inguinale* erhobenen Erregerbefunde zu bestätigen (NAUCK und MALAMOS), sondern konnten bei einer Anzahl von uns isolierten Stämmen Morphologie und Entwicklung des Erregers sowohl im infizierten tierischen Gewebe (Affen, Mäuse) als auch in der Kultur (Epithel von Kaninchen-Cornea) in sehr zahlreichen Präparaten genau studieren. Gegenwärtig verfügen wir über drei Stämme, die wir als *virus fixe* fortlaufend als Passagen auf Mäusegehirnen weiterführen (Stamm I seit 16.11.37 : 139 Passagen; Stamm F seit 12.1.38 : 133 Passagen; Stamm Sch. seit 28.10.38 : 56 Passagen).

Das färberische Verhalten und die Vermehrung des Erregers in den befallenen Zellen hat — wie zugegeben werden muss — gewisse Eigentümlichkeiten, die diesen Erreger von der Gruppe bestimmter Viruskrankheiten mit intracellulärer Erregerentwicklung und Einschlussbildung (Variola-Vaccine, Kanarienvogelvirus, Ektromelie) deutlich unterscheidet und eine gewisse Übereinstimmung mit der Rickettsiengruppe erkennen lässt. Von dem Vorhandensein eines Entwicklungszyklus, wie er von DONATIEN und LESTOQUARD für die ganze Rickettsiengruppe als charakteristisch beschrieben wird, konnten

wir uns nicht überzeugen. Vor allem glauben wir nicht, dass die Entwicklung von homogenen als "Initialkörper" aufzufassenden Massen ausgeht, aus denen sich dann Fragmente und Granula aufteilen, die zu den Rickettsien-ähnlichen Formen werden. Es handelt sich nach unserer Auffassung um einen einfachen Vermehrungsvorgang, bei dem wohl zunächst die Erreger in kompakteren Massen zusammenliegen, wobei auch Reaktionsprodukte der Zelle mit eingeschlossen sein können. Das charakteristische ist aber bei der weiteren Entwicklung die Verflüssigung, Vakuolenbildung und "Ballonierung" des Zellinhalts, bei manchmal enormer Vermehrung von Erregern innerhalb einer einzelnen Zelle. Auffällig ist immer wieder, dass nur einzelne Zellen befallen sind, die ihren Inhalt nach Zerstörung an die Umgebung frei geben, während manche Teile des Präparates völlig frei von Erregern sind. Die gelegentlich auftretenden grösseren Formen, die auch von FINDLAY erwähnt und mit Psittakose-Formen verglichen wurden und die sich durch ihre starke Färbbarkeit von den typischen Körperchen unterscheiden,sind zum Teil Reste veränderter Zellsubstanz innerhalb der Vakuolen oder es handelt sich dabei um besonders veränderte Wuchsformen, die aber nicht notwendigerweise zu einem "konstanten Entwicklungszyklus des Erregers" gehören. Die typischen keineswegs sehr polymorphen Erregerformen sind durchaus gleichmässig in Grösse, Form und Färbbarkeit und besitzen fast durchweg sphärische Formen (zuweilen auch Diploformen) im Gegensatz zu den bei typischen Rickettsien häufig auch vorhandenen Stäbchenformen.

In biologischer Hinsicht sind im Gegensatz zu diesen nicht einmal vollständigen morphologischen Übereinstimmungen keinerlei Beziehungen vorhanden, die auf eine Verwandtschaft mit der Rickettsiengruppe schliessen lassen. Wohl sind die *Lymphogranuloma inguinale* - Erreger ausserhalb des Organismus ausserordentlich empfindlich, gehen schnell zugrunde und lassen sich nur mit Schwierigkeiten und nur unter Anwendung von gewebezüchterischen Methoden in der Kultur am Leben erhalten und zur Vermehrung bringen. Aber schon die Affinität gegenüber bestimmten Zellelementen weist merkliche Unterschiede auf. Während bei der Mehrzahl der echten Rickettsiosen in erster Linie Gefässendothelien befallen werden und auch die pathologisch-anatomischen Veränderungen eindeutig auf die vorwiegende Beteiligung der Gefässe hindeuten (Exanthem, Petechien, Veränderungen an den Hirngefässen) spielt sich das pathologische Geschehen beim *Lymphogranuloma inguinale* im wesentlichen im Lymphgewebe ab. Auch bei der experimentellen Verimpfung auf das Affen- oder Mäusegehirn sind es die Lymphräume der weichen Hirnhäute und die perivasculären Lymph-

bahnen, die betroffen sind, nicht die Gefässwandungen selbst. In den Ausstrichen sind es nicht nur monocytäre Elemente, die Erreger enthalten, sondern auch andere Zellen, gelegentlich Leukozyten und in der Kultur sogar Epithelien.

Ein wesentlicher Unterschied besteht auch in immunbiologischer Hinsicht. Die echten Rickettsiosen führen meist zu einer deutlichen Immunität mit besonderen serologischen fassbaren Phänomenen. (WEIL-FELIX-Reaktion, spezifische Agglutination der Rickettsien). Beim *Lymphogranuloma inguinale* scheint es degegen nur zu einer lokalen Gewebsimmunität und auch das in einem beschränkten Umfange zu kommen. Der Erreger kann sich nach Zurückgehen der Krankheitserscheinungen sogar noch lange Zeit in aktiver Form im Gewebe halten. Virulizide Schutzstoffe können, wie wir in Übereinstimmung mit LOEHE und SCHLOSSBERGER in wiederholten Versuchsreihen nachweisen konnten, weder beim erkrankten Menschen noch beim Versuchstier in nennenswertem Umfang festgestellt werden. Die für die Rickettsiengruppe charakteristische als Gruppenagglutination aufgefasste Weil-Felixsche-Reaktion fällt, wie wir uns selbst überzeugen konnten, sowohl bei erkrankten Menschen als auch bei Versuchstieren in verschiedenen Stadien der Infektion negativ aus. Die Immunitätsverhältnisse bei *Lymphogranuloma* sprechen also durchaus gegen einen näheren Verwandtschaftsgrad mit den Rickettsien.

Auch das für die Zugehörigkeit der Rickettsiengruppe wichtige, wenn auch vielleicht nach den neuesten Anschauungen nicht mehr allgemeingültige Kriterium der Übertragbarkeit durch Arthropoden fehlt beim *Lymphogranuloma inguinale,* dessen Übertragung und Verbreitung als geschlechtliche Infektion als sicher gilt. Nach den von WEIGL angeführten Argumenten müsste man bei etwaigen Versuchen, *Lymphogranuloma inguinale*-Material durch anale Einführung auf die Laus zu übertragen mit der allergrössten Vorsicht und Kritik vorgehen.

Zusammenfassend möchte ich meine Ansicht dahin äussern, dass wir vorläufig nicht berechtigt sind, den Erreger des *Lymphogranuloma inguinale* ohne weiteres den Rickettsien zuzurechnen, auch nicht unter Aufstellung eines neuen den Rickettsien verwandten Genus. Wie auch bei den der Virusgruppe zugerechneten Erregern sollte man sich zunächst darauf beschränken, jeden einzelnen Krankheitskeim in morphologischer und biologischer Hinsicht gesondert zu betrachten und die verwandtschaftlichen oder trennenden Merkmale genauer studieren, ehe man zu weiteren Klassifizierungen und Systembildungen schreitet.

## SCHRIFTTUM


BUSSACA — Über das Vorhandensein von Rickettsienähnlichen Körperchen in den trachomatösen Organen von mit Trachomvirus geimpften Tieren. *Graefes Arch. f. Ophtalmol.* 133: 41 (1934).

BRUMPT — Rickettsia intracellulaire stomacale (Rickettsia culici n. sp.) de Culex fatigans. *Ann. de Paras. hum. et comp.* 16: 153 (1939).

CAMINOPETROS — Présence dans les tissus atteints de lymphogranulomatose vénérienne à forme bubonique ou ano-rectale d'un microorganisme revêtant les caractères d'un "Rickettsia". *Bull. Acad. de Méd.*, Paris 119: 697 (1938).

CUÉNOD et NATAF — Nouvelles recherches sur le trachom. *Presse méd.* 1936, 921.

COLES — A Rickettsia-like Organism in the Conjunctiva of Sheep. 17*th Rep. of dir. vet. serv.* Onderstepoort 1931, 175.

DONATIEN et LESTOQUARD — Du cycle évolutif de quelques Rickettsia. *Bull. Soc. de Path. Exot.* 31: 593 (1938).

FINDLAY — Climatic bubo or Lymphogranuloma inguinale. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.* 31: 587 (1938).

FOLEY et PARROT — Sur la Rickettsia du trachome. *C. R. Soc. Biol.* 124: 230 (1937).

FOLEY et PARROT — Rickettsia du trachome. *Arch. Inst. Past. Algerie* 15: 339 (1937).

LÖHE und SCHLOSSBERGER — Der heutige Stand neuerer Kenntnisse vom Lymphogranuloma inguinale. *Med. Klinik* 1937, Nr. 43 und 44.

MALAMOS — Züchtung des Lymphogranuloma inguinale-Virus auf Kaninchen-Cornea-Epithelkulturen. *Ztbl. f. Bakt.* 143: 1, (1939).

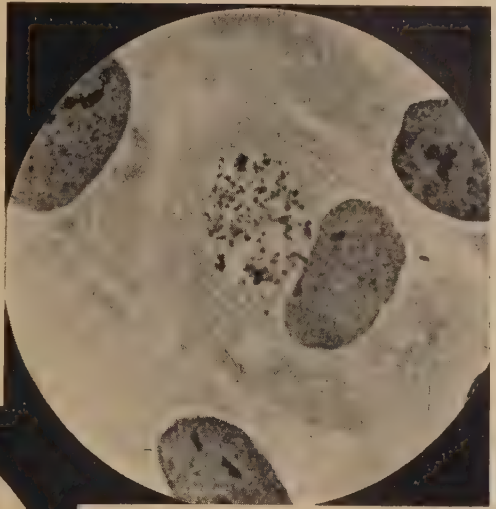
MIYAGAWA u. MITARBEITER — Studies on the Virus of Lymphogranuloma inguinale. *Jap. J. exp. Med.* 13: 1 (1935).

NAUCK u. MALAMOS — Über Erregerbefunde bei Lymphogranuloma inguinale. *Arch. Schiffs-u. Tropenhyg.* 41: 537 (1937).

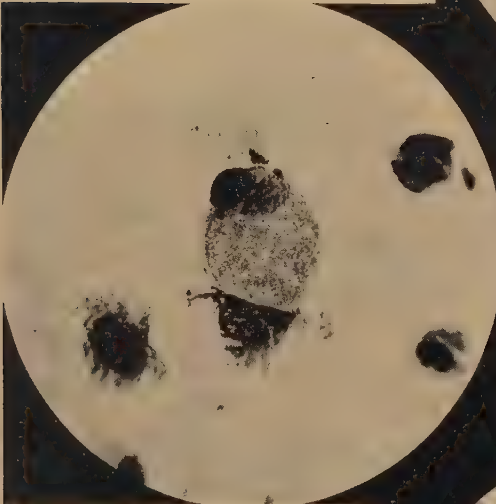
POLEFF — Die neuesten Ergebnisse der ätiologischen Trachomforschung. *Klin. Monatsbl. f. Augenhlkd.* 99: 584 (1937).


———o———

Fig. A - *Lymphogranuloma inguinale* Erregerkolonie. Epithelkultur (Kaninchen - Cornea) Giemsafärbung



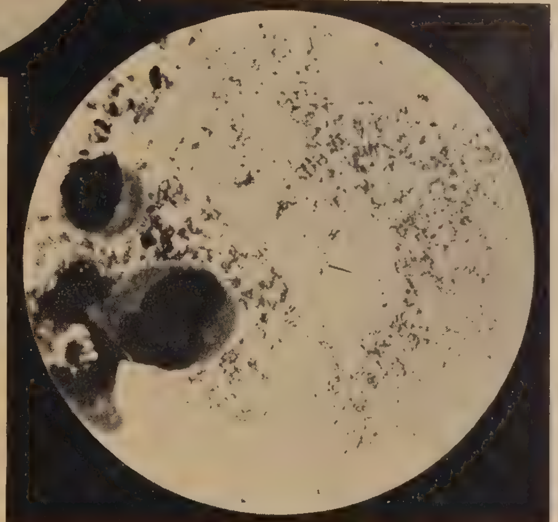
A



B

Fig. B - *Lymphogranuloma inguinale.* Intrazelluläre Entwicklung des Erregers. Ausstrich aus infiziertem Mäusegehirn

Fig. C - *Lymphogranuloma inguinale* Körperchen nach Austritt aus infizierten Zellen. Ausstrich aus infiziertem Mäusegehirn. Giemsafärbung



C

# ARTRITE EM GALINHA, PRODUZIDA POR "BACTERIUM ARTHROPYOGENES", n. sp.

POR

P. Nóbrega

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 47-50

Em dezembro de 1939 recebeu a Secção de Ornitopatologia do Instituto Biológico, para exame, duas galinhas (caso 6472) que apresentavam tipo particular de artrite causada por germe ainda não conhecido, que será descrito no presente trabalho.

Uma das galinhas apresentava inchaço na planta do pé e em um dos dedos (estampa 47, fig. B), a outra, cinco tumores de tamanho variavel em torno da articulação tíbio-társica esquerda (estampa 47, fig. A). O proprietário das aves possuia, em lote de 15 galinhas, 5 nessas condições.

Eram os tumores de consistência mole e agrupavam-se ao redor da articulação, principalmente para cima, onde eram delimitados pelas bolsas articulares e inserções ligamentosas e tendinosas. Tratava-se de processo inflamatório do qual se recolhia, por punção, grande quantidade de líquido amarelo muito viscoso e de aspecto purulento.

O esfregaço do pús corado pelo método de GRAM apresentava alguns bacilos gram-negativos; em esfregaços corados pelo GIEMSA notavam-se ainda alguns monocitos e numerosos pseudo-eosinófilos.

Em todos os casos, tanto nos exames a fresco quanto nos de esfregaços corados, não se encontraram clavas ou grãos do tipo dos que ocorrem em lesões produzidas pelo *Actinobacillus lignièresi* e germes próximos.

De ambas as galinhas doentes semeamos sangue e pús em caldo e em placas de agar e de meio de Holt-Harris e Teague. Nos meios sólidos não obtivemos culturas; ao contrário, vegetaram os tubos de caldo semeados com pús de ambas as aves e com o sangue de uma delas. Verificamos depois que a não vegetação das placas de agar semeadas com o material original dependia da escassez de germes no sangue e no pús, pois a partir de culturas em caldo foi sempre possivel obter vegetação em agar. No meio de Holt-Harris e Teague, ao contrário, jamais obtivemos cultura.

## CARACTERES DO GERME ISOLADO

O micróbio isolado, que pelas razões mais adiante expostas descrevemos como espécie nova sob o nome de *Bacterium arthropyogenes*, apresenta os seguintes caracteres:

MORFOLOGIA E COLORAÇÃO: — Bactérias médias, de 1.5-3 *micra* por 0.5-0.7 *micra*, gram-negativas, não ácido-resistentes, não esporuladas, não capsuladas. Em esfregaços de cultura em agar apresentam-se isoladas ou em grupos de duas, algumas com coloração nitidamente bipolar; em caldo, ao lado de elementos curtos, verificam-se formações estreptobacilares, com cadeias às vezes constituidas de 5-7 elementos, e tambem fórmas filamentosas que pódem atingir 8 *micra* de comprimento e até mais; esses filamentos apresentam coloração irregular pelo método de Giemsa, mostrando alternância de zonas densas, bem coradas, e de faixas mal coradas.

Tanto as culturas desenvolvidas à temperatura ambiente quanto as desenvolvidas a 37° mostram bactérias imoveis, tendo-se feito esta verificação em gota pendente e em agar a 0.3% (técnica de Hitchens).

PROPRIEDADES CULTURAIS: — Vegeta nos meios comuns de laboratório, é aeróbio e facultativamente anaeróbio, crescendo bem em meio de Tarozzi e em placas de agar-sangue em anaerobiose.

Caldo simples: em 24 hs. a 37°, crescimento delicado e homogêneo; ao fim de dois ou tres dias, mesmo quando conservada a cultura em geladeira, aparecimento de depósito floconoso que facilmente se dissolve por agitação.

Agar-sangue hemolisado a 0.1%, em placa: colônias brilhantes, ligeiramente opacas, azuladas, isodiamétricas, que lembram em parte as das fórmas azues de *Pasteurella avicida*. O diametro medio da colônia após 24 hs. a 37°C é de 0,5-1 mm.

Batata: vegeta mal, formando delicado induto de côr levemente amarela.

Agar-sangue de carneiro: ausência de hemólise.

Gelatina: em tubos semeados por picada, a vegetação, que é discreta, é mais abundante na superfície, tornando-se filiforme ao longo da picada. O meio não é fluidificado (observação feita em culturas desenvolvidas à temperatura ambiente e tambem em culturas vegetadas a 37° durante 8 dias e depois colocadas no gelo meia hora antes da leitura).

RESISTÊNCIA: — Morre pelo aquecimento em banho-maria a 56°C. durante 10 minutos. Culturas em caldo simples, agar-gelatina e agar simples, mantidas na geladeira a 5°, permanecem viaveis em geral

somente até 20 dias. À temperatura ambiente conservam-se vivas pelo menos até 2 meses.

CARACTERES BIOQUÍMICOS: — Ação sobre os carbohidratos: as observações sobre capacidade fermentativa foram feitas durante 30 dias tanto em meio semisólido quanto em meio líquido, consistindo este em caldo-extrato de carne e aquele em agar semisólido, aos quais se adicionava o açucar a estudar na razão de 1%, depois de esterilizado por filtração (produtos da fábrica Pfanstiehl Chemical Co.), usando-se como indicador a solução de Andrade a 1 por cento.

O germe produz ácido, mas não gás, em glicose, sacarose, maltose, xilose, dextrina. Não ataca lactose, manita, salicina, dulcita, adonita, arabinose, ramnose.

Produção de indol: negativa (água peptonada, cultura de 1-4 dias a 37º, reativo de EHRLICH-BOHME).

Ação sobre o leite: acidifica em 24 hs. o leite tornasolado, sem outra qualquer alteração subsequente.

Produção de gás sulfídrico: negativa (pesquisa feita seja semeando a amostra em agar-acetado de chumbo com hiposulfito de sódio, seja semeando-a em tubo de agar inclinado a cuja rolha se adapta lingueta de papel de filtro embebido em solução saturada de acetato de chumbo, segundo técnica de ZO BELL e FELTHAM (8).

Provas de V. P. e V. M.: negativas, tendo-se feito a reação de V. P. de acôrdo com a técnica de BARRITT (1).

Catalase: positiva.

Redução de nitratos a nitritos e produção de amônea: seguimos o método indicado em "Pure Culture Study of Bacteria", vol. 3, n.º 1 (6). A pesquisa de amônea foi feita com reativo de HANSEN (2) e a de nitritos com ácido sulfanílico e alfanaftilamina (5), tendo-se o cuidado de em todos os casos fazer reações em branco com meios não semeados. As culturas foram feitas em meios com 18 por mil de agar, que permitem melhor desenvolvimento do germe e, consequentemente, reação mais nítida do que a observada em meios líquidos.

Nestas condições observamos redução de nitratos a nitritos em agar nitratado comum (3) e em meio sintético cuja única fonte de azoto era o nitrato (4). Neste último meio verificamos tambem produção de amônea; como o reativo de Hansen não é específico para amônea, revelando tambem certas aminas presentes em alguns meios orgânicos de uso comum nos laboratórios, patenteia-se a necessidade

do controle obrigatório em meios não semeados; a tabela 1 mostra, com efeito, que a verificação da produção de amônea em consequência da redução de nitratos somente foi demonstrada de maneira indiscutivel no meio sintético cuja única fonte de azoto era o nitrato (verificação feita após 4 dias a 37°).

TABELA 1

Produção de nitritos e de amônea em meios diversos por *Bacterium arthropyogenes*:

| Meios usados | | Nitritos | R. de Hansen |
|---|---|---|---|
| Agar nitratado . | semeado . . . | + | + |
| | não semeado. . | — | + |
| Agar sem nitrato | semeado . . . | — | + |
| | não semeado. . | — | + |
| Meio sintético . | semeado . . . | + | + |
| | não semeado. . | — | — |

REAÇÕES SOROLÓGICAS: — O sôro das duas galinhas com doença espontânea aglutinava o germe até a diluição de 1:320. O sôro de galinha colhido 10 dias após infecção experimental por via articular, aglutinava a amostra a 1:40, ao passo que o sôro de galinha inoculada na veia se mostrava ativo até 1:640.

A tabela 2 mostra o resultado das provas de aglutinação feitas com sôro de galinha injetada 9 dias antes na veia.

TABELA 2

Provas de aglutinação de diversas amostras bacterianas em presença de sôro anti- *B. arthropyogenes*

| Amostras | Sôro arthropyogenes, dil. | | | | | | | Sôro de gal. normal dil. | | Sol. fis. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 20 | 40 | |
| *B. arthropyogenes* . . | + | + | + | + | + | + | + | — | — | — |
| *Pasteurella avicida* . . | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| *Salmonella pullorum* . | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| *B. pseudot. rodentium* . | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| *Actinobacillus lignièresi* | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Em coelho obtivemos sôro com título até de 1:1280, injetando na veia, com intervalos de 5 dias, doses variaveis de 0.5-5 cc. de cultura em caldo de 24 hs., viva. O sôro assim obtido comporta-se exata-

mente como o de galinha imunizada, em relação às amostras constantes da tabela 2. Inversamente, um sôro preparado nas mesmas condições contra *A. lignièresi* aglutina este germe até 1:320, mas não aglutina a bactéria por nós estudada.

PODER PATOGÊNICO: — Coelhos, cobaias e camondongos resistem à inoculação, por todas as vias, de doses maciças de cultura. Cobaias machos inoculadas intraperitonealmente com suspensões concentradas de culturas em agar não apresentam reação de STRAUSS, a qual se observa após inoculação de *Actinobacillus lignièresi* e de certas outras espécies bacterianas.

Conforme referimos no início deste trabalho, *B. arthropyogenes* ocorre em galinhas, nelas determinando doença que consiste em artrite de natureza grave, desenvolvida na articulação tíbio-társica ou nas articulações da pata; outros órgãos acham-se comprometidos na doença espontânea, nos quais entretanto se desenvolvem apenas lesões de natureza microscópica.

Não sabemos como se infectam espontaneamente as aves.

As experiências de infecção experimental de galinhas foram feitas com culturas em caldo de 48 horas, sendo umas galinhas inoculadas com 0.2 cc. na articulação tíbio-társica e outras com 1 cc. na veia da asa. Foram os seguintes os resultados obtidos:

Todas as 15 galinhas inoculadas na articulação apresentaram sinais de artrite a partir do terceiro dia, com intensa inflamação periarticular; duas delas apresentavam, além disso, vários nódulos ao nivel da articulação, estendendo-se o processo supuratico ao longo de toda a perna, comprometendo músculos e tendões. Morrem as aves após período variavel de 5 a 25 dias, isolando-se em todos os casos o germe da articulação doente; duas vezes foi o germe tambem isolado do fígado e, em um caso, do exsudato fibrinoso que se encontrava abundante no pericárdio. Em 5 casos as lesões regrediram após periodo de 20 dias a um mês.

De 21 galinhas inoculadas na veia, 14 morreram depois de prasos variaveis de 3 a 23 dias (média 13 dias), reisolando-se o germe, em todos os casos, dos processos inflamatórios que se formaram em torno da articulação tíbio-társica; uma vez foi o germe isolado tambem do fígado; em duas aves, nas quais observamos pericardite, isolou-se o germe do exsudato fibrinoso do pericárdio. Em 13 dessas galinhas ambas as articulações tíbio-társicas foram atingidas, desenvolvendo-se em 6 aves intensos processos supurativos ao longo da tíbia, provocando destruição quasi completa de músculos e tendões. Seis galinhas não apresentaram manifestação de espécie alguma e

uma revelou processo inflamatório difuso ao longo da tíbia esquerda, que persiste ainda, tres meses após a inoculação.

A introdução de grandes doses de *B. arthropyogenes* por via oral em galinhas e pintos revelou-se completamente inócua.

Dez galinhas injetadas na veia e na articulação com *A. lignièresi* mostraram-se completamente resistentes.

PRODUÇÃO DE TOXINA: — Culturas em caldo simples de 10 dias e 1 mês, incubadas a 37° foram divididas em duas partes, uma das quais foi filtrada em véla e outra aquecida a 60° durante 1 hora. Galinhas injetadas com esses materiais, em doses variaveis de 2 a 10 cc., nada apresentam, o que permite concluir pela não formação de toxina nas condições experimentadas.

## LESÕES HISTOPATOLÓGICAS

As lesões iniciais, que se observam ao nivel da articulação propriamente dita (sinóvias, cápsulas e bolsas articulares) consistem em infiltração intensa de pseudo-eosinófilos, congestão dos vasos e formação de abscessos. Dentro das bolsas sinoviais, muito distendidas, encontra-se apreciavel quantidade de pús. O mesmo processo inflamatório póde atingir por continuidade os ligamentos e musculos que se inserem em torno da articulação tíbio-társica. Posteriormente forma-se tecido de granulação caracterizado sobretudo por grande neoformação de vasos, infiltração perivascular e aparecimento de células gigantes. Quando plenamente evoluido o processo, tem-se o quadro completo de uma panartrite, com comprometimento profundo da articulação e dos tecidos vizinhos.

Alterações de natureza idêntica encontram-se em alguns outros órgãos. No fígado, observam-se, em geral, numerosos nódulos inflamatórios microscópicos, constituidos por infiltração de pseudo-eosinófilos formando microabscessos disseminados por todo o parênquima. Igualmente intensa é a infiltração de células redondas ao redor dos vasos.

No rim observa-se grande proliferação de células endoteliais nos capilares dos glomérulos e acúmulo de pseudo-eosinófilos dentro dos túbulos renais e no parênquima, entre os túbulos.

No pulmão são menos evidentes as alterações, constituidas especialmente de infiltrações perivasculares.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

O germe por nós descrito apresenta, dum modo geral, as propriedades do gênero *Bacterium* no sentido de TOPLEY e WILSON (7), embora por algumas particularidades dele se afaste, muito especial-

mente pelo fato de não ser "parasita tipicamente intestinal"; é de notar, ainda, a sua tendência á formação, em meios líquidos, de longos filamentos, sua localização quasi exclusiva nas articulações, onde determina formação de artrite, sua pequena capacidade de conservação em geladeira a 5°. A ausência de clavas, a não patogenicidade para cobaias e algumas diferenças culturais permitem excluí-lo do gênero *Actinobacillus*. Diversidades morfológicas e sorológicas afastam-no do gênero *Pasteurella*, assim como sua completa ausência de patogenicidade para animais de laboratório, excetuada a galinha.

Pelas razões acima expostas julgamos melhor, pelo menos provisoriamente, incluir a amostra em questão no gênero *Bacterium*, embora reconheçamos não ser representante típico desse gênero.

Na literatura ornitopatológica é ainda completamente desconhecida a existência de bactéria semelhante à que descrevemos, produtora de artrite purulenta em galinha. Trata-se, pois, de espécie nova, para a qual propomos, à vista de suas propriedades, o nome de *Bacterium arthropyogenes* n. sp.

Agradecemos ao Dr. J. REIS a preparação dos córtes histológicos e o auxilio prestado na redação deste trabalho.

## ARTHRITIS IN FOWLS CAUSED BY "BACTERIUM ARTHROPYOGENES", n. sp.

### *Abstract*

*This paper deals with a new bacterial species which the author calls Bacterium arthropyogenes, the genus Bacterium being used here according to the definition given by* TOPLEY *and* WILSON *(7).*

*Bacterium arthropyogenes was found to be the cause of spontaneous arthritis in fowls and was isolated from 5 cases of this disease which occurred in a smal flock of 15 birds.*

*Arthritis is easily produced in fowls after inoculation of B. arthropyogenes either directly into the joints or intravenously.*

*The following are the characteristics of B. arthropyogenes:*

*Habitat: parasitic. Found in joints and sometimes in the blood of chickens with arthritis.*

*Morphology: rods measuring 1.5-3 micra by 0.5-0.7 micra, forming no spores and showing no capsule. The bacilli are non-motile and stain evenly and easily with the ordinary dyes; Gram-negative, non acid-fast. In broth there occur also streptobacillary forms, with 5-7 elements, and long filaments which may attain the*

*lenght of 10 micra and even more; such filaments do not stain evenly with Giemsa's stain, but show a somewhat barred aspect.*

*Cultural requirements: The species grows well in the ordinary laboratory media and is aerobic and facultatively anaerobic.*

*Hemolysed blood agar: grows well at 37° forming somewhat bluish colonies similar to those of the "blue type" of Pasteurella avicida. These colonies are circular, raised, convex, smooth, shining and slightly opague, about 0.5-1 mm. in diameter with an entire edge. On first isolation growth is usually not obtained on agar plate, but easily in broth.*

*Broth: delicate growth with a uniform turbidity. After 2-3 days a flocculent deposit appears which may easily be dispersed by agitation.*

*Gelatin stab: moderate growth on the surface and filiform growth along the stab. The medium is not liquefied (observation made either after a 6 days incubation at 23° or after cooling in the ice-chest cultures which had been kept 4 days at 37°).*

*Blood agar plate: no hemolysis.*

*Potato: scant growth with a faintly yellow colour.*

*Resistance: Does not withstand heating to 58° for 10 minutes. Cultures in gelatine-agar, agar and broth do not survive more than 20 days when kept in the ice-box at 5°. At room temperature cultures remain alive for at least 2 months.*

*Biochemical activities: acid, no gas, in glucose, sucrose, maltose, xylose, dextrin, rhamnose. Lactose, mannitol, salicin and dulcite are not attacked even after 30 days. Litmus milk is acidified in 24 hs., but not clotted. Indol is not produced. $H_2S$ not formed. V B and V M negative. Nitrates are reduced and ammonea is produced. Catalase: positive.*

*Serological reactions: Agglutinated by the serum of animals infected either spontaneously or experimentally with B. arthropyogenes. Agglutinating sera are easily obtained in rabbits through the inoculation of live cultures. As to the agglutinative properties of such sera see table 2.*

*Pathogenicity: No exotoxin is formed. In chickens it gives rise to a disease consisting of large abscesses in and around the joints and to a lesser degree to microabscesses in the liver. In the lungs and spleen one observes perivascular infiltrations. The joint lesions were experimentally produced either by intravenous or intra-articular injections of B. arthropyogenes.*

*Rabbits, guinea-pigs and mice are refractory. Male guineapigs do not show the Strauss reaction when inoculated intraperitoneally with the germ.*

## BIBLIOGRAFIA


1 — Barritt, M. M. — 1936 — The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of alpha-naphtol. *Jour. Path. and Bact.*, 42, 441-454.

2 — Hansen, P. A. — 1930 — The detection of ammonia production by bacteria in agar slants. *Jour. Bact.*, 19, 223-229.

3 — Committee on Bact. Technic. — 1933 — Manual of Methods for pure culture of Bacteria, II, 33, pag. 6.

4 — Idem — 1933 — Ibidem, II, 33, pag. 12.

5 — Idem — 1934 — Ibidem, V, 34, pag. 17.

6 — Idem — 1935 — Ibidem, V, 35, pp. 10-13.

7 — Topley, W. W. C. e G. S. Wilson — 1938 — The principles of Bacteriology and immunity, William Wood & Co., Baltimore, 2.ª edição, 1645 pp.

8 — Zo Bell, C. A. e Feltham, C. B. — 1934 — A comparison of lead, bismuth and iron as detectors of hydrogen sulphide produced by bacterias. *Jour. Bact.*, 28, 169-178.


———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 47

Fig. *A* — Abscessos periarticulares em galinha produzida por *B. arthropyogenes.* Caso espontaneo.

Fig. *B* — Abscesso plantar em galinha produzido por *B. arthropyogenes.* Caso espontaneo.

Fig. *C* — Abscesso periarticular em galinha consequente à inoculação intravenosa de *B. arthropyogenes.* Notar extensão do processo ao longo da tibia.

### Estampa 48

Figs. *A* e *B* — Processos inflamatorios ao nivel da articulação tibio-tarsica em galinhas inoculadas respectivamente na articulação e na veia com *B. arthropyogenes.*

Figs. *C* e *D* — *B. arthropyogenes.* Esfregaço de cultura em caldo de 24 hs. a 37º. Notar cadeias e longos filamentos.

Fig. *E* — *B. arthropyogenes,* esfregaço de cultura em agar 24 hs. a 37º.

### Estampa 49

Fig. *A* — Corte da região periarticular tibio-tarsica de galinha inoculada na veia com *B. arthropyogenes.* Notar intensa infiltração de leucocitos pseudo-eosinófilos.

Fig. *B* — Corte ao nivel da articulação tibio-tarsica de galinha inoculada na veia com *B. arthropyogenes.* Notar formação de abscesso ao nivel do ligamento articular.

### Estampa 50

Figs. *A* e *D* — Corte de rim de galinha com infecção espontanea por *B. arthropyogenes.* Notar coleção de pseudo-eosinófilos no interior de alguns tubulos renais. Em *D*, infiltração parenquimatosa.

Fig. *B* — Corte de rim de galinha injetada na veia com *B. arthropyogenes.* Notar processo de glomerulite com proliferação das células do glomerulo.

Fig. *C* — Corte de figado de galinha com infecção espontanea por *B. arthropyogenes.* Notar formação de microabscessos e zona de necrose.

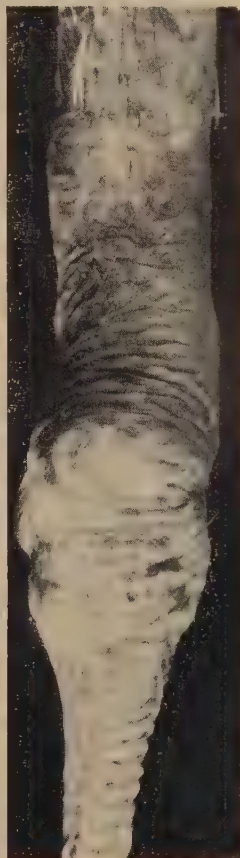
———o———



A



B



C



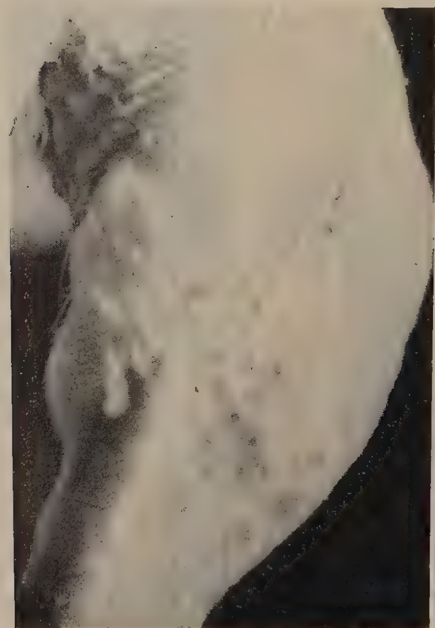
A



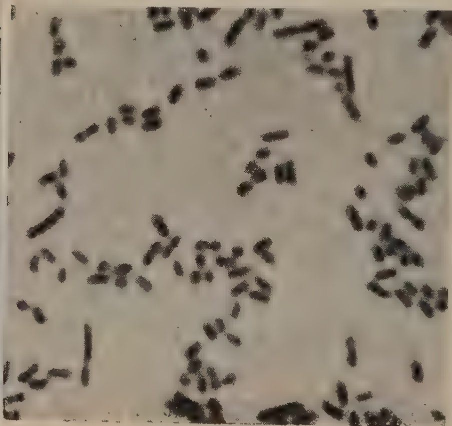
C



D



B

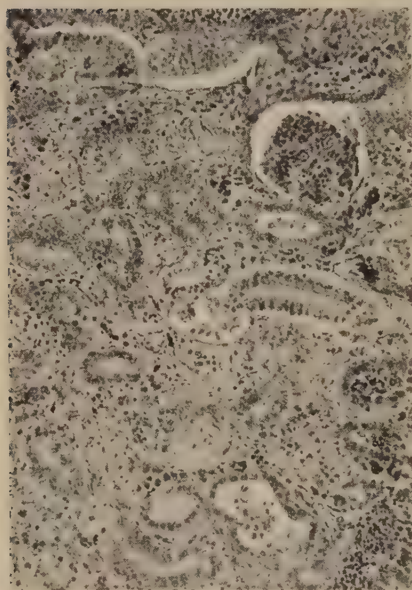


E

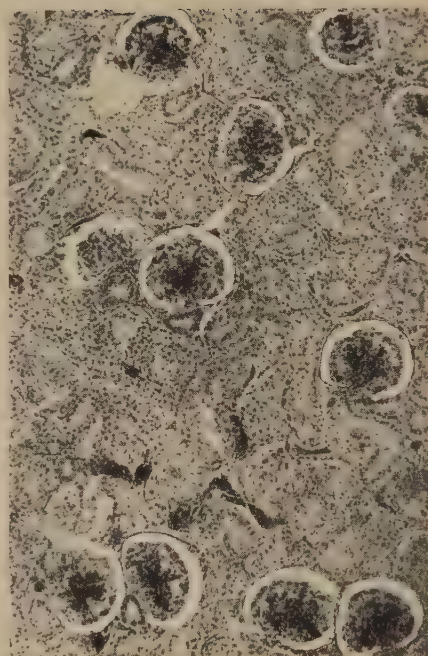


*A*

*B*



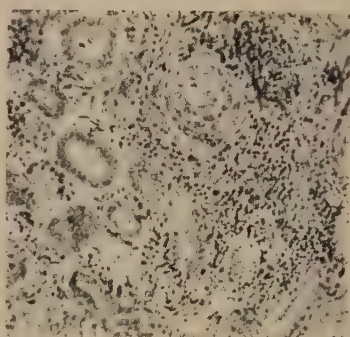
*A*



*B*



*C*



*D*

# BLUTZUCKERSPIEGEL UND MALARIA.
## EINE CHEMOTHERAPEUTISCHE STUDIE

VON
Dr. Manfred Oesterlin, Tropeninstitut, Hamburg

Im Jahre 1911 hat SCHERN (1) die Beobachtung gemacht, dass im Blutserum ein Stoff vorhanden ist, welcher von den Trypanosomen verbraucht wird und durch Zugabe von frischem Serum ersetzt werden kann. Dieser Stoff ist Glukose. Man kann diese bei den Trypanosomen auch durch andere Kohlehydrate wie Lävulose, Maltose, Dextrose oder Glykogen ersetzen. 25 Jahre später greift SCHERN (2) auf diese Beobachtung zurück und untersucht die Trypanosomeninfektion von Muriden unter dem Einfluss blutzuckersenkender Körper, wie Urethan, Phosphor und Phlorrhizin. Kurz vorher hatten N. u. H. v. JANCSO (3) unter ganz ähnlichen Gedankengängen die Einwirkung synthetischer Insulinersatzmittel auf die Trypanosomiasis der Maus und Ratte studiert. Diese Autoren benützen vor allem Synthalin, Synthalin B und ein synthetisiertes Produkt von FÖLDI (4). (Formel III). SCHERN wie JANCSO sahen, dass die Herabsetzung des Blutzuckerwertes die Lebensdauer der infizierten Tiere verlängert und dass es sogar möglich ist, bei mehrfacher und vorsichtiger Dosierung die Tiere mit Synthalin B völlig auszuheilen.

N. u. H. v. JANCSO glaubten, für diesen Heilungseffekt einzig und allein die Milieuänderung verantwortlich machen zu können, während SCHERN die Meinung vertrat, dass neben der "glykopriven" Wirkung auch noch eine direkt schädigende auf die Parasiten vorhanden sein müsse. Diese Ansicht SCHERNs sollte in der Folge Recht behalten, denn C. H. BROWNING (5) wies dann später nach, dass die Trypanosomen auch in vitro von Synthalin getötet werden. Den entgültigen Beweiss für eine direkte Arzneiwirkung erbrachte aber LOURIE (6). Es gelang ihm, Trypanosomen gegen Synthalin zu festigen. Diese Festigung griff nur auf Präparate ähnlicher Konstitution und mit analoger Reaktionsweise über, nicht auf Arsenderivate, Trypaflavin oder Germanin. Vom Gesichtspunkte JANCSOs aus durfte dagegen eine Arzneifestigung überhaupt nicht eintreten, denn sie wäre gleichbedeutend gewesen mit einer Festigung gegen Nahrungsmangel.

Die Ursache der blutzuckersenkenden Wirkung der Synthaline ist bis heute noch nicht ganz aufgeklärt. Während SLOTTA (7) meint, diesen Stoffen eine katalytische Wirkung auf die Zuckeroxydation zuschreiben zu müssen, weist STAUB (8) nach, dass unter ihrem Einfluss der Glykogengehalt der Leber und Muskulatur schwindet. DEVINE (9)

beweist dann, dass dieser Glykogenschwund dadurch hervorgerufen wird, dass die Re-synthese dieses Kohlehydrates gestört ist. Neben solchen stoffwechsel-physiologischen Auswirkungen zeigen die Synthaline, wie JUNKMANN (10) am Frosch und V. ISSEKUTZ (11) am Kaninchen beweissen, noch lähmende Wirkungen auf die motorischen und zentralen Nerven; dieser pharmakologische Effekt ist jedoch durch Traubenzuckerzufuhr nicht zu beeinflussen. Nach all diesen Befunden ist der pharmakologische Einfluss dieser Verbindungsklasse recht verwickelt und jener auf die Trypanosomen unklar.

Vor ca. 2 Jahren hat nun ASCOLI (12) bekannt gegeben, dass es möglich ist, mit langsam steigenden Dosen Adrenalin oder Suprarenin die Chininwirkung eindringlich zu unterstützen. Seine Befunde konnten inzwischen mehrfach bestätigt werden. Die markanteste Wirkung dieses für die Blutverteilung wichtigen Hormons ist die Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Es war nun theoretisch denkbar, dass Parasiten mit ausgeprägter Wirtsspezifität — und dazu gehören ja schliesslich die Malariaparasiten des Menschen — an eine normale Blutzuckerkonzentration weitgehend angepasst sind, sodass sie jede Aenderung dieses Wertes nach oben oder unten als schädigend empfinden.

Gegen eine solche Auffassung sprachen allerdings die Erfahrungen der Klinik. PINELLI (13) z. B. hat 54 Fälle zusammengestellt, bei welchen ein Diabetes, oft in schwerster Form, neben einer Malaria bestand. Seinen Beobachtungen zufolge ist zwischen beiden Erkrankungen keinerlei Abhängigkeit vorhanden. Auch MENK und BOCK (14) haben vor kurzem einen Diabetesfall (mit über 250 mg% Blutzucker) mit gleichzeitiger chronischer Malaria ausführlicher beschrieben.

Andererseits aber war es KING, LOURIE und YORKE (15) gelungen, aus einer grossen Anzahl neuer Verbindungen (es handelt sich um Aminbasen, Thioharnstoffe, Amidine u. s. w.) das Undecandiamidin- 1, 11 als trypanocid und blutzuckersenkend zu erkennen und CHRISTOPHERS und FULTON (16) weisen dann nach, dass dieses Diamidin auch Malariawirkung besitzt. DEVINE (9) zeigt, dass zwischen der Pharmakologie der Synthaline und jener des Undecandiamidins eine weitgehende Analogie vorhanden ist. So war denn wieder jenes eigenartige Zusammentreffen zwischen Beeinflussung des Blutzuckerspiegels und Malariawirkung augenscheinlich.

Um diese im ganzen sich widersprechenden Ergebnisse eingehender zu beleuchten, wurden nun weitere Präparate synthetisiert, um an Hand dieser zu entscheiden, ob in der Tat eine solche Abhängigkeit zwischen Milieuänderung und parasitärem Effekt vorhanden ist. Die Versuche wurden ausschliesslich an mit Plasm. präcox infizierten

Kanarien vorgenommen. Die Substanzen in maximaler Dosis oral über 6 Tage gegeben.

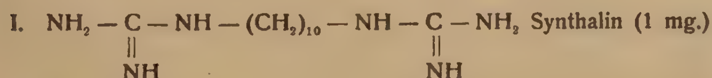
Als erste Stoffe kamen die Synthaline (*) zur Untersuchung, welche beide eine schwache jedoch deutlich vorhandene Verzögerung der Infektion hervorriefen.

Dagegen versagte das von FOELDI erstmals hergestellte Präparat (Formel III) völlig. JANCSO (3) hatte in seinen Trypanosomenstudien das gleiche Präparat erfolgreich eingesetzt gehabt und v. ISSEKUTZ (11) hatte nachgewiesen, dass es pharmakologisch den Synthalinen nahesteht. Es wäre also, wenn die Herabsetzung des Blutzuckerspiegels für die Malariawirkung verantwortlich zu machen wäre, von diesem FOELDI-schen Präparat ein ebenso ausgeprägter Effekt zu erwarten gewesen.

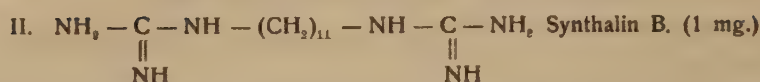
Das völlige Versagen des Stoffes deutete aber doch darauf hin, dass diese Abhängigkeit nicht vorhanden ist und dieser Befund konnte weiter durch die Prüfung der einfachen Biguanide (Formel IV u. V) erhärtet werden, welche nach SLOTTA (17) ebenfalls blutzuckersenkend sind, im Vogelmalariaversuch aber wirkungslos blieben.

Es war nach diesen Ergebnissen immerhin denkbar, dass nicht die Blutzuckersenkung die Malaricidie der Stoffe bestimmt, sondern die in der Struktur vorhandene Guanidgruppierung. Dafür sprach auch der Befund von KING, LOURIE und YORKE, welche neben dem schon erwähnten Undecandiamidin (Formel VI) das p-p-Diguanido-diphenylmethan als wirksam angegeben hatten. Es wurden daher in der Folge eine Anzahl von Guaniden und Biguaniden mit und ohne basischer Komponente hergestellt und systematisch im Vogelmalariaversuch geprüft. Kein einziges der Präparate erfüllte jedoch die eingesetzte Hoffnung, sie zeigten sich ausnahmslos ohne jede Wirkung.

Der Kürze halber sollen nur die chemischen Formeln ohne weitere Anführung der chemischen Nomenklatur aufgezeigt werden. Die Herstellung der Stoffe bot im Grunde keine besonderen Schwierigkeiten, wenngleich der Arbeitsgang manchmal recht lang und das notwendige Arbeiten mit einem der unangenehmsten Stoffe der Chemie, dem Merkaptan, nicht unbedingt erfreulich war. Die am Ende der Formel in Klammern angegebenen Zahlen bedeuten die tägl. verabreichte Menge in mg oral beim Kanarienvogel.




(*) Auch an dieser Stelle sei der Firma Schering A. G. Berlin, für die Ueberlassung der Präparate freundlichst gedankt.

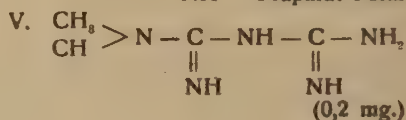


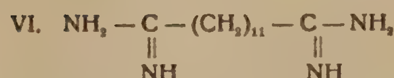


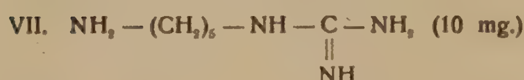


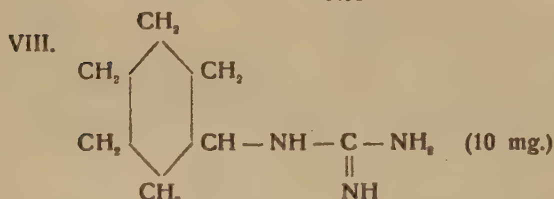


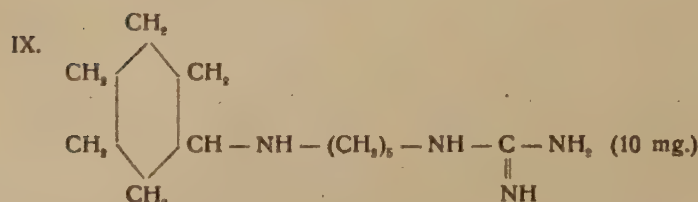

IV. $CH_3 - NH - C(=NH) - NH - C(=NH) - NH_2$ (0,2 mg.)

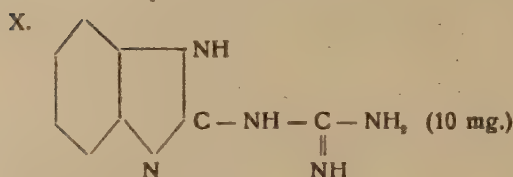


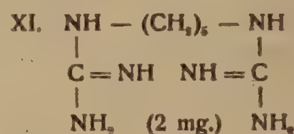



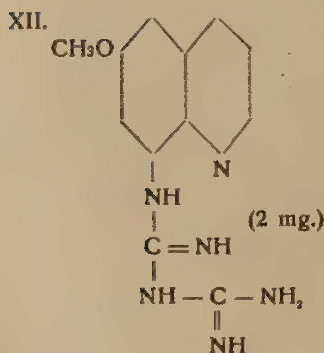



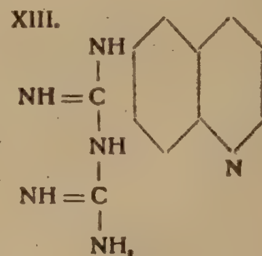



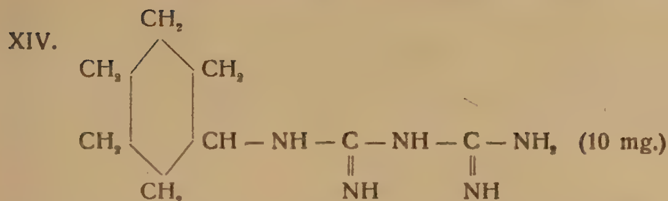



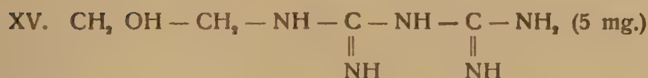



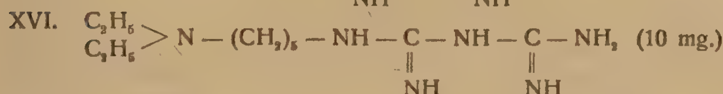
XIV.



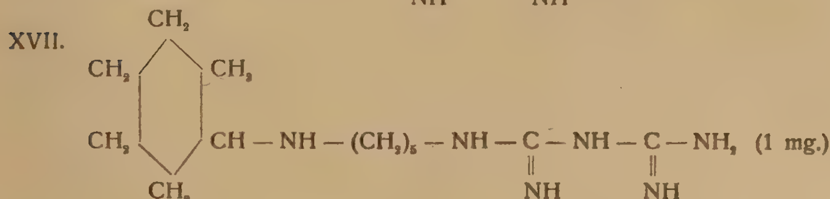
XV.



XVI.



XVII.



Zusammenfassend kann also in aller Kürze gesagt werden, dass die Einwirkung der Synthaline und anderer Guanidinderivate und Biguanide auf den Blutzucker in keinerlei Zusammenhang steht mit der Malariawirkung dieser Stoffe. Allem Anscheine nach handelt es sich nicht um eine Wirkung infolge Milieuänderung, sondern um eine direkte Medikamentwirkung.

## SCHRIFTENNACHWEIS


1 — SCHERN, K. — Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, 38: 338 (1911).
2 — SCHERN, K. u. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE — Zeitschr. Immun.-forschg. 89: 21 u. 484 (1936).
3 — V. JANCSO, H. u. N. — Zeitschr. f. Immun.-forschg. 86: 1 (1935).
4 — FÖLDI, Z. — Ber. Deutsch. Chem. Ges. 62: 1700 (1929).
5 — BROWNING, C. H. — Journ. of Pathol. 46: 323 (1938).
6 — LOURIE, E. M. un YORKE, W. — Ann. trop. Med. 32: 201 (1938).
7 — SLOTTA, K. H. — Grundriss der modernen Arzneimittelsynthese, Verl. Enke, Stuttgart. 1931. Seite 74.
8 — STAUB — Zeitschr. f. klin. Med. 107: 607 (1928).
9 — DEVINE, J. — Ann. trop. Med. 32: 163 (1938).
10 — JUNKMANN — Arch. exper. Pathol. u. Pharmakol. 122: 184 (1927).
11 — V. ISSEKUTZ, H. — Arch. exper. Pathol. u. Pharmakol. 146: 97 (1929).
12 — ASCOLI — Münchn. Med. Wo. 370 (1937).
13 — PINELLI, L. — Clin. Med. Ital. 66: (4), 303 (1935).
14 — MENK, W. u. BOCK, E. — Arch. f. Schiffs-u. Tropenkrankh. 41: 751 (1937).
15 — KING, H., LOURIE, E. M., YORKE, W. — Ann. trop. Med. 32: 177 (1938).
16 — CHRISTOPHERS, R. u. FULTON, D. — Ann. trop. Med. 32: 257 (1938).
17 — SLOTTA, K. H. u. TSCHESCHE — Ber. Deutsch. Chem. Ges. 62: 1398 (1929).


———o———

# VACINAÇÃO NA PESTE SUINA COM POLPA DE BAÇO TRATADA PELO CRISTAL VIOLETA

POR

A. M. Penha

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Os processos de imunisação habitualmente usados na peste dos porcos, consistindo na injeção de sôro só (imunisação passiva) ou na injeção simultânea de sôro e virus (imunisação ativa), são, na prática, caros e trabalhosos. Por isso procurava-se de ha muito obtêr métodos de vacinação contra a peste suina que evitassem o emprego de quantidades elevadas de sôro, produto de manejo delicado e obtenção dificil. Apesar dos esforços empregados por numerosos pesquisadores, só ha poucos anos foram obtidos resultados animadores nêsse sentido. Depois de experimentar sem sucesso varias substâncias químicas empregadas no preparo de vacinas contra outras doenças animais, verificou DORSET, a quem devemos a aquisição dos conhecimentos mais importantes quanto à peste suina, que o sangue dos animais infectados, tratado pelo cristal violeta na estufa a 37°C., em concentração e tempo apropriados, constitue uma vacina excelente contra a peste dos porcos. Após a morte dêsse grande pesquisador, as experiências foram continuadas por MCBRYDE e COLE, que em 1936 publicaram os detalhes do método de obtenção da vacina, bem como os resultados obtidos nas diversas provas de vacinação realisadas até então. A proteção conferida pela vacina era de 98%. Posteriormente, MUNCE (1937) e EDGINGTON e SCHALK (1939) experimentaram tambem a vacina de DORSET; os resultados não foram porém tão brilhantes como os de MCBRYDE e COLE.

Os autores citados trabalharam sempre com vacinas preparadas com sangue virulento; mas desde 1933 BOYNTON tinha mostrado a possibilidade de se obtêrem vacinas eficientes contra a peste suina empregando certos órgãos de animais infectados. O método consistia em preparar uma polpa bem fina com os tecidos dêsses órgãos, emulsioná-la em volume igual de água fisiológica e glicerina e tratá-la depois pelo eucaliptol na geladeira. O tempo de atenuação era variavel, decorrendo cerca de 8 semanas antes que fossem feitas as primeiras provas. Polpas de baço, ganglios linfaticos, testiculo e medula ossea foram as que deram melhor resultado.

Tendo aparecido em meiados do ano de 1939, nos arredores da cidade de S. Paulo, uma epizootia de peste suina, que depois se esten-

deu a outros muncipios visinhos, aproveitámos a oportunidade para estudar alguns métodos de vacinação contra essa doença. As primeiras experiências foram feitas com vacinas preparadas pelo método do cristal violeta de DORSET, usando sangue desfibrinado. Simultaneamente foram experimentados tambem, a título de ensaio, sangue citratado e polpa de baço, atenuados pelo mesmo processo. Os resultados satisfatórios obtidos com a vacina de baço animaram-nos a fazer um estudo mais detalhado dêsse tipo de vacina, examinando novas partidas em maior número de animais.

As vacinas preparadas com sangue foram obtidas juntando 5 partes da solução aquosa de cristal violeta a 1%, a 100 partes de sangue. As outras foram feitas com baços de porcos sangrados a branco no 7.º ou 8.º dia de infecção, com sinais evidentes de molestia, falta de apetite e febre alta, acima de 41ºC., apresentando na necropsia lesões hemorrágicas de peste em vários órgãos. O sangue destinava-se á hiperimunisação de porcos, e os baços, colhidos com relativa assepsia, eram desembaraçados da gordura e passados na máquina de moer carne. O modelo usado era "Universal n.º 2", adaptando-se faca apropriada para moer. Caso não fosse possivel fazer tudo no mesmo dia, os baços eram guardados na geladeira em água fenicada a 0,5% e passados na máquina no dia seguinte. Tomava-se uma parte dessa polpa, juntavam-se duas partes de água fenicada a 0,5 %, agitava-se bem e depois adicionavam-se 5 cc. de solução aquosa de cristal violeta Grübler a 1% para cada 100 cc. da emulsão de polpa de baço. A mistura era posta em balões que permaneciam 14 dias a 37ºC, agitando-se diariamente, e por fim conservada na geladeira mais ou menos a 3ºC. Passava-se em gase antes de injetar.

As partidas de vacina discriminadas abaixo foram numeradas de acôrdo com a ordem de preparo. As doses empregadas, quando não se especifiquem outras, eram de 10 cc., injetadas por via intramuscular na face interna da coxa. Os porcos eram animais castrados, pesando cerca de 30 a 50 kg., provenientes todos de uma criação isenta de peste suina; alguns eram de raças nacionais, outros Duroc-Jersey, a maioria mestiços.

O virus empregado na inoculação de prova era preparado pouco antes de usar, triturando-se em gral fragmentos de baço de porcos mortos de peste aguda; emulsionava-se a polpa em duas ou tres partes de água fisiológica e por fim filtrava-se em gase. Os fragmentos de baço eram conservados na geladeira em água glicerinada a 50%.

EXPERIÊNCIAS.

Foram feitas seis series de observações preliminares discriminadas pelas letras do alfabeto. Os algarismos romanos indicam o número de cada partida de vacina e, quando não provoque confusão, indica tambem o lote de porcos submetidos á vacinação.

Observação A: I) Vacina preparada com sangue desfibrinado, fenicado a 0,5%. Porcos injetados: dois. Dose unica de 10 cc.

II) Vacina preparada com polpa de baço, sem juntar ácido fenico. Porcos injetados: dois. Dose unica de 10 cc.

III) Vacina preparada com sangue citratado, sem juntar acido fenico. Porcos injetados: tres. Dose unica de 10 cc.

IV) Vacina preparada com polpa de baço, fenicada a 0,5%. Porcos injetados: tres. Dose unica de 10 cc.

Vinte dias depois da vacinação, oito desses dez porcos receberam, cada um, 0,5 cc. de virus, ao mesmo tempo que dois testemunhas que foram reunidos aos lotes III e IV, um em cada lote. Nêstes mesmos lotes ficaram ainda os dois porcos vacinados restantes, mas não inoculados com virus, para prova de contaminação.

Os porcos inoculados com virus adoeceram todos, com falta de apetite e febre. No lote I morreu um; no III morreram dois; os tres de peste aguda e quasi no mesmo praso que os testemunhas. Os dois porcos submetidos á prova de contaminação mostraram-se mais tarde imunes, resistindo á inoculação diréta do virus. Nos lotes II e IV, ambos de vacina de baço, não houve perdas a registrar.

Observação B: Em vista dos resultados satisfatórios obtidos com as vacinas de baço na série A, foi feita nova experiência com a partida II, dois meses depois de ter sido retirada esta da estufa. Foram vacinados cinco porcos com dose unica de 10 cc. Cinco semanas depois, receberam 1 cc. de virus cada um, bem como dois testemunhas: estes morreram de peste aguda, ao passo que os vacinados nada sofreram.

Observação C: Vacina V preparada com polpa de baço, fenicada a 0,5%. Foram vacinados dois lotes de cinco porcos cada um: o primeiro com dose unica de 5 cc. e o segundo com dose unica de 10 cc. Vinte e dois dias depois foi feita a prova infectante inoculando-se 1 cc. de virus em cada porco. Os testemunhas e o virus foram os mesmos usados simultaneamente na serie B. Os vacinados nada sofreram.

Observação D: Nesta série, comparamos a partida VI preparada com polpa de baço, com a vacina contra o Hog Cholera dos Laboratórios Cutter (Berkeley, California), preparada pelo método de BOYNTON. Um lote de cinco porcos recebeu a vacina VI na dose unica de 10 cc.; outro lote tambem de cinco porcos recebeu a vacina de BOYNTON em duas doses de 5 cc. cada uma, com intervalo de 14 dias. Trinta e seis dias depois da primeira dose, foram todos inoculados com 2 cc. de virus cada um, bem como dois testemunhas. No lote da vacina de baço morreu um (o menor) de peste aguda e quatro nada sofreram. No lote da vacina de BOYNTON, morreu um tambem, dois adoeceram e sararam e dois nada sofreram. Os testemunhas morreram de peste.

Observação E: Vacina VII, preparada com polpa de baço fenicada a 0,5%. Foram vacinados cinco porcos com dose unica de 10 cc. Vinte e dois dias

depois fez-se a inoculação de prova de 1 cc. de virus. Morreu um porco de peste e resistiram quatro.

Esta mesma vacina provada quinze dias apenas depois da aplicação só protegeu 5 dos 23 porcos vacinados, isto é, pouco mais de 1 em 5. A comparação desta experiencia com a antecedente, na qual houve ao contrario proteção de 4 dos 5 porcos vacinados, mostra claramente que a imunidade leva mais de 15 dias para se estabelecer solidamente.

Observação F: Vacina VIII, preparada com polpa de baço fenicada a 0,3%. Foram vacinados cinco porcos com dose unica de 10 cc. Vinte dias depois fez-se inoculação de prova de 1 cc. de virus. Morreram dois porcos de peste e resistiram tres.

## VACINAÇÃO DE CAMPO

As experiências acima relatadas foram realisadas no decurso do processo de obtenção do sôro imunisante contra a peste suina, destinado a combater a epizootia que aparecera em meiados de 1939 em numerosas criações de porcos existentes nos arredores da cidade de S. Paulo. A maioria dessas criações era praticada por pequenos chacareiros que compravam lixo da cidade para adubar suas terras e aproveitavam os residuos culinários nêle contidos para engordar porcos adquiridos para êsse fim; outros, em vez do lixo, utilisavam restos de hotel para alimentar os porcos.

A peste dos porcos não era doença desconhecida no Brasil. A julgar pelo resultado do inquerito que LACERDA pôde apurar, a peste suina foi-nos importada do Rio da Prata ha mais de 40 anos em levas de porcos trazidas a Santa Cruz, uma das quais, conduzida para o sul do Estado de Minas Gerais, propagou a doença aos municipios visinhos do Estado de S. Paulo. A epizootia que então se produziu provocou grandes prejuizos, matando, só no Estado de Minas Gerais, cerca de 50.000 animais, com um indice de mortalidade avaliado por LACERDA em 80%. Mas, por causas desconhecidas, a peste perdeu depois o carater agudo que habitualmente reveste, passando a se manifestar sob a forma de casos isolados, esporadicos, reproduzindo-se a intervalos nos sitios onde a epizootia havia provocado os seus estragos.

Fato indêntico deve ter-se passado em S. Paulo. Durante muitos anos os criadores paulistas, por analogia com o que se fazia em Minas, tratavam como peste uma doença a que denominavam vulgarmente de "Batedeira" em virtude da frequência com que se observava o arfar dos flancos motivado pela dispnéa que apresentavam quasi sempre os porcos doentes. Os dados epidemiológicos, porém, já faziam suspeitar que a "Batedeira" não era peste, tendo sido por fim demonstrado experimentalmente por BUENO, em 1939, que se tratava, em tais casos, da gripe dos leitões. Comtudo a peste não havia desaparecido completamente do Estado, como eu mesmo pude verificar

desde 1931, conforme trabalho publicado tres anos mais tarde. E' verdade que se tratava sempre de focos bem circunscritos, que nunca tomavam o caracter de verdadeira epizootia. As necropsias e as inoculações experimentais realizadas então, não deixavam porém duvida alguma a respeito da identidade da doença. Num dos casos tratava-se de um reprodutor puro sangue recem-importado dos Estados Unidos, o que punha nitidamente em evidência a possibilidade, ainda não excluida de todo, da eventual importação da peste diretamente do seu paiz de origem.

A epizootia atual foi incontestavelmente favorecida em sua propagação pelo método de alimentação com lixo e restos de hotel, usado pelos chacareiros. Depois a doença propagou-se aos outros municipios do Estado, provocando em alguns dêles grandes prejuizos. Só no municipio da Capital morreram em 1939 cerca de 14.000 porcos, num total de pouco mais de 21.000.

A medida urgente a tomar era a imediata imunisação classica com sôro. Quando se verificou, ha quasi dez anos, a existencia de fócos de peste suina no Estado de S. Paulo, prevendo-se uma possivel explosão dela em caráter epizootico, como aconteceu agora, foi sugerido que o Estado empreendesse logo a fabricação do sôro imunisante especifico, unica arma que se possuia naquela época contra a peste dos porcos. Apesar dos esforços empregados repetidas vezes nesse sentido, motivos alheios á nossa vontade impediram que se levasse a bom termo tal empreendimento em escala comercial. As primeiras tentativas, realisadas com exito a titulo de ensaio, nunca puderam passar além do dominio do laboratorio. Por outro lado a relativa raridade da peste verificada até havia pouco entre nós, desinteressava algumas firmas nacionais e estrangeiras que haviam tentado a colocação do sôro contra a peste dos porcos no Brasil. Recorremos, por isso, ao sôro argentino, do Laboratorio "Fuerte Sancti Spiritu", mais accessivel e barato no momento, que se revelou, aliás, de excelente eficacia no combate á epizootia em curso.

Nêsse interim, estudavamos a vacina de cristal violeta e, em vista dos resultados favoráveis acima relatados, obtidos com a vacina de baço, foram tentadas algumas aplicações de campo. A primeira verificou-se numa pequena criação de 67 cabeças, onde tinham sido diagnosticados tres casos iniciais de peste. No dia imediato procedemos á vacinação dos animais restantes, empregando dose unica de 10 cc. da partida VI já provada no laboratorio. Verificaram-se dois casos

ainda de peste, ocorridos dentro da primeira semana que se seguiu á vacinação; os animais restantes nada sofreram. Passados tres mezes, a imunidade foi provada em duas porcas excluidas da criação, que resistiram perfeitamente á inoculação do virus ativo.

Outra aplicação da vacina só, foi feita numa criação que vinha perdendo uma meia duzia de porcos diariamente. Tomada a precaução de sacrificar todos os animais febris (cerca de vinte), os restantes, em número de 98, receberam vacina de baço na dose unica de 10 cc. Nas duas semanas seguintes morreram ainda doze porcos; depois a mortandade parou, não tendo até hoje reaparecido mais a peste. Nêste, como no caso anterior, a vacina sósinha conseguiu dominar completamente a epizootia.

Foram feitas ainda aplicações da vacina de baço em duas outras criações de porcos, de 500 a 700 cabeças cada uma. Ambas apresentavam condições higienicas apropriadas e haviam sido anteriormente imunisadas com sôro e virus, pelo método simultâneo. Depois passou-se á aplicação sistematica da vacina em todos os leitões desmamados. As doses têm sido de 10 e de 5 cc. aplicadas uma só vez a cada leitão. Os resultados colhidos até agora podem ser considerados excelentes.

Nêsse interim procedia-se tambem á vacinação das pequenas criações dos chacareiros dos arredores de S. Paulo. Depois de alguns insucessos provocados pelo uso de vacinas de outros órgãos, passou-se a empregar somente sôro nas criações infectadas, reservando a vacina para as criações visinhas diretamente ameaçadas. As pessimas condições higienicas aliadas ás dificuldades materiais de isolamento, mandam que nas criações já contaminadas se empregue o sôro, de ação mais imediata, em logar da vacina. Foram aplicadas nessas condições, de Janeiro a Setembro de 1940, cerca de 5.500 doses de vacina. Os resultados obtidos são em geral satisfatórios e constarão de um relatório circunstanciado a ser publicado mais tarde, quando as observações estiverem completas.

O rendimento da vacina de baço é pequeno. Um porco de 50 Kg. não dá mais de 20 doses de 10 cc. de vacina. E' natural, portanto, que se procure aumentar êsse rendimento, diminuindo a dose ou empregando outros órgãos no preparo da vacina. A dose de 5 cc. é provavelmente suficiente, mas requer-se maior experiência para aconselhá-la definitivamente. Quanto ao emprego de outros órgãos, as experiências realisadas por nós até agora só permitem conclusões provisorias. O figado e os rins parece que não dão bôa vacina de cristal violeta. O mesmo se pode dizer do sangue; mas a mistura de sangue, baço, ganglios linfaticos e medula ossea parece dar bôa vacina na dose de 20 cc.

A propria vacina de baço teve seu modo de preparo melhorado. Póde-se empregar o baço não só dos porcos de virus sangrados a branco, como tambem dos animais mortos de peste e necropsiados poucas horas depois, antes de aparecerem alterações cadavericas. Como a colheita dos órgãos dificilmente é feita com rigorosa assepsia, costumava-se juntar 0,5% de fenol para favorecer a insuficiente ação bactericida do cristal violeta. Sabe-se hoje, porém, que o virus da peste dos porcos conserva-se melhor em meio francamente acido, pH proximo de 5. Daí a vantagem de se aumentar um pouco o teor de acido fenico da mistura, de maneira a aproximá-la mais dêsse pH ótimo, favorecendo ao mesmo tempo a ação bactericida. Por êsse motivo a formula da vacina atualmente empregada por nós passou a ser a seguinte:

| | |
|---|---|
| Polpa fina de baço . . . . . . . . . . . | 100 cc. |
| Água fenicada a 1% . . . . . . . . . . | 200 cc. |
| Solução de cristal violeta a 1% . . . . . | 15 cc. |

Os órgãos podem ser conservados na solução de fenol um ou dois dias na geladeira, antes de serem passados na máquina.

Em virtude das condições inherentes ás porcadas em que foram feitas as aplicações da vacina, muitas delas têm o valor de uma verdadeira experiência. O tipo de alimentação, as condições gerais de higiene, a promiscuidade completa entre os animais e a frequente aquisição de novos porcos, constituem sem duvida fatores extremamente favoraveis á manutenção do estado de infecção dessas porcadas. Mas apesar dessa situação desfavoravel, os porcos vacinados em tempo oportuno, na maioria das vezes resistem, ao passo que outros nas mesmas condições, mas não vacinados, morrem de peste.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Com a polpa de baço de porcos infectados artificialmente e sangrados a branco no acme da doença, pode-se obter pelo método de DORSET do cristal violeta, uma vacina eficiente contra a peste dos porcos. O rendimento obtido é de cerca de 20 doses de 10 cc. por porco; mas com dose de 5 cc. ainda se obtem resultados satisfatórios. Essa vacina não provoca acidente nos animais injetados. A imunidade á inoculação de prova leva cerca de 20 dias para se estabelecer, mas apesar disso, a vacina de baço pôde ser aplicada com sucesso na imunisação de uma porcada com peste suina em plena evolução, tomando-se medidas complementares de isolamento e desinfecção.

Pelo processo aqui descrito, a obtenção da vacina torna-se bastante economica, porque permite utilisar ainda o sangue virulento para o preparo do sôro imunisante contra a peste suina.

## HOG CHOLERA VACCINATION BY MEANS OF SPLEEN TISSUE VACCINE ATTENUATED WITH CRISTAL VIOLET


### *Abstract*

*This paper deals with the experimental and field vaccination against hog cholera by means of a spleen tissue vaccine attenuated with cristal violet ofter* DORSET. *The artificialy infected swines are bled for virus in order to obtain the hog cholera serum, and the spleens used for the vaccine; each animal gives more or less 20 dosis of 10 cc., but it seems that 5 cc., are still effective. The vaccine gives no reaction and the immunity is strong enough 20 and more days after vaccination, but not within 15 days. Notwithstanding, in one instance, it was possible to stop a hog cholera infection in a herd by means of this vaccine. Until now 5.500 field vaccinations were made with good results. The last formula used is the following:*

| | |
|---|---|
| *Spleen tissue finely ground . . . .* | *100 cc.* |
| *Carbolic acid, 1% solution . . . . .* | *200 cc.* |
| *Cristal violet, 1% solution . . . . .* | *15 cc.* |


### BIBLIOGRAFIA


LACERDA, J. B. — 1899 — Relatorio sobre a peste dos suinos no Estado de Minas Geraes. Bello Horizonte.

PENHA, A. M. — 1934 — Casos de peste dos porcos observados em S. Paulo. *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo, 5: 137-141.

McBRYDE, C. N. and COLE, C. G. — 1936 — Cristal-violet vaccine for the prevention of hog cholera: progress report. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.* **89**: 652-663.

MUNCE, T. M. — 1937 — Experiments with cristal-violet hog cholera vaccine. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.* **90**: 307-319.

BOYNTON, W. H., WOODS, G. M. and WOOD, F. W. — 1937 — Progress in hog cholera control with tissue vaccine. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.* **90**: 321-325.

BUENO, P. — 1939 — Etiologia da pneumonia contagiosa dos suinos. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo*, **10**: 279-289.

EDGINGTON, B. H. and SCHALK, A. F. — 1939 — Some tests with cristal-violet vaccine for prevention of hog cholera. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.* **94**: 501-509.

CHAPIN, R. M., POWICK, W. C., McBRYDE, C. N. and COLE. C. G. — 1939 — The influence of hydrogen-ion concentration on the survival of hog cholera virus in defibrinated blood. *Journ. Am. Vet. Med. Ass.* **95**: 494-496.


———o———

# SÔBRE A VERDADEIRA NATUREZA DAS "FORMAS AMEBOIDES", DOS PRETENSOS "CISTOS" E FORMAS DEGENERATIVAS" NO GÊNERO "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836"

POR

C. Pereira e W. F. de Almeida

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 101 figuras no texto e estampas 51-56

## INTRODUÇÃO

Em 1860 LAMBL refere pela primeira vez o encontro, em material de origem humana, de "amebas" de comportamento muito especial, para as quais mais tarde foi proposta a denominação de *Entamoeba undulans* CASTELLANI, 1905. Tais formas foram posteriormente referidas pela generalidade dos autores como aspecto particular de *Trichomonas hominis* (DAVAINE, 1860).

De então para cá, formas aflageladas, ou com flagelos não exteriorizados, capazes de emitir pseudópodos, têm sido encontradas por numerosos protozoologistas nas mais diversas espécies do gênero *Trichomonas* DONNÉ, 1836; muitas vezes foram relacionadas com processos de encistamento, simples, ou então complicado com autogamia, ou ainda mais complexamente pela intromissão de outros protistas nos fenômenos estudados; outras vezes foram consideradas formas em degeneração de tais flagelados.

A correta interpretação do ciclo evolutivo das espécies do gênero *Trichomonas* tem esbarrado sucessivamente ora em causas de erro, cujo afastamento é possivel, após sua identificação, ora em preconceito teórico, que levou vários autores a uma falsa interpretação de fenômenos que chegaram mesmo a ser muito bem observados.

O preconceito consistiu em julgar-se necessária a existência de cistos nas espécies dêste gênero, afim de se compreender como um indivíduo poderia tornar-se infestado, nos moldes do que acontece com muitos outros protozoários habitantes de cavidades naturais dos diferentes tipos de hospedeiros.

Uma primeira causa de êrro, de natureza vegetal, foram as espécies de *Blastocystis* ALEXEIEFF, 1911 na qual incorreram PERRONCITO (1888), SCHAUDINN (1903), PROWAZEK (1904), UCKE (1908), PROWAZEK (1908), BOHNE e PROWAZEK (1908), BENZEN (1910), WENYON (1910), LYNCH (1915), BARLOW (1916) e, mais recente-

mente, MENZANI (1933 e 1939), frequentemente obscurecida pela idéia de SCHAUDINN (1903), admitindo o aparecimento de formas ameboides que copulavam, transformando-se em estruturas hoje reconhecíveis como de *Blastocystis.*

Outra causa de êrro foram os cistos de flagelados semelhantes, como ocorreu com GALLI-VALERIO (1900) em relação a cistos de *Giardia* e, em 1904 com protozoários de vida livre; com PROWAZEK (1904), que considerou mastigontes mono e binucleados de *Proteromonas* como cistos de conjugação de *Trichomonas* segundo GRASSÉ (1926); com DOBELL (1909), relativamente aos de espécie do gênero *Embadomonas,* conforme verificação de BISHOP (1931); com ALEXEIEFF (1914), a respeito de estruturas dificilmente definíveis; com LYNCH (1916, a respeito de *Chilomastix,* corrigidas pelo proprio autor em 1922, e com ESCOMEL (1913), relativamente a possíveis protozoários de vida livre, a julgar pelo incrível relato de sua experiência no saneamento de Arequipa.

A existência de formas ameboides, consequentes à simplificação do aparelho cinético de tais flagelados, tem sido relacionada repetidas vezes com o mecanismo de formação de cistos, não só pelos autores já citados, como por FANTHAM (1910), KUCZYNSKI (1914), BRUG (1917), CHATTON (1918) segundo GRASSÉ (1926), BOYD (1919), O. DA FONSECA (1920), MAYER (1920), WENRICH (1921), WENYON (1907 e 1926), TANABE (1926), GRASSÉ (1926), SCHMID e KAMNIKER (1926), GALLI VALERIO (1927), DOFLEIN e REICHENOW (1929), GWÉLÉSSIANY (1929), LYNCH (1930), WENRICH (1931 e 1939), PENSO (1932), BLAND, GOLDSTEIN, WENRICH e WEINER (1932), trabalhos êstes baseados principalmente em considerações de ordem morfológica.

As formas ameboides, quando consideradas no ponto de vista de seu comportamento já foram encaradas como estádios de degeneração por MARCHAN (1894), FANTHAN (1910), MARTIN e ROBERTSON (1912) ("degenerate dividing forms"), WENYON (1915), WENYON e O'CONNOR (1917), DOBELL e O'CONNOR (1921), WENYON (1926) ("degenerating forms"), DOFLEIN e REICHENOW (1929) ("degenerativ veränderte individuem"), BISHOP (1931), POWELL (1936) e WENRICH (1931 e 1939) tanto em fezes diarreicas como corrimentos vaginais e em culturas.

Ora, desde 1935 um de nós (C. P.) tem se preocupado com o estudo das formas ameboides em espécies do gênero *Trichomonas,* embora com intermitências, verificando que sua significação é completamente outra, pois tais formas ameboides ocorrem sempre que a taxa de divisão do flagelado é muito elevada, seja em culturas, seja nos diversos hospedeiros, constituindo portanto não um sinal de encista-

mento, fenômeno que positivamente não ocorre no gênero, pelo menos acompanhado de tradução morfológica, nem de degeneração, o que não teria sentido em face das condições em que o fato é observado, mas, pelo contrário, a indicação de uma vitalidade muito intensa do flagelado, acompanhada de um grande saldo anabólico, que o conduz a um ritmo de proliferação extremamente rápido.

## MATERIAL

O principal material com que trabalhamos foi o *Trichomonas vitali* PINTO e F. DA FONSECA, 1926, descrito originariamente de *Bufo marinus*.

Deve ser esta espécie que BRUMPT e LAVIER, 1924, assinalaram em girinos de *Leptodactylus ocellatus*, sendo por nós cultivada não só de adultos desta espécie como também dos de *Bufo paracnemis* e do hospedeiro-tipo. Não encontramos motivos de ordem morfológica que apoiassem a creação de *Trichomonas boae* REICHENOW, 1929?, descrita de *Boa constrictor* e que, em quanto não for demonstrado o contrário, parece-nos deve ser considerada sinônimo de *T. vitali.*

Esta espécie foi estudada tanto em esfregaços de intestino de anfíbios como em culturas.

Os fatos observados em *T. vitali* foram encontrados também em *Trichomonas muris* (GRASSI, 1879) e *T. caviae* DAVAINE, 1875, não só em culturas como no intestino, e em *Trichomonas hominis* (DAVAINE, 1860) também em culturas como em fezes diarreicas.

Formas ameboides muito abundantes de *Trichomonas* spp. foram observados por C. PEREIRA e P. NOBREGA (1935) (resultados inéditos) em lesões pseudo-cruposas da abóbada palatina e faringe de borrachos, bem como em lesões semelhantes que ocupavam região desde o faringe ao proventrículo de pintos.

## TÉCNICA

O estudo morfológico foi feito inicialmente em esfregaços fixados a úmido, pelo BOUIN, SCHAUDINN, ZENKER e HELLY, corados pelas lacas ferrosas dos derivados da hematoxilina, segundo HEIDENHAIN, DOBELL e de FREITAS.

Entretanto, resultados muito melhores foram obtidos, principalmente no que diz respeito aos detalhes do aparelho cinético, com o emprêgo de esfregaços a sêco, refixados pelo metanol, recobertos por sôro de cavalo e corados inicialmente pelo método panótico de PAPPENHEIM, posteriormente por um corante do tipo ROMANOWSKY, feito no laboratório do seguinte modo: tratamento do azul metileno segundo TRIBONDEAU e DUBREIL; sua filtração a quente; secagem do precipitado; combinação do filtrado com eosina, filtração e secagem do eosinato obtido.

A solução corante tem a seguinte composição:

| | |
|---|---|
| Precipitado de Tribondeau e Dubreil . . . . . . | 0,50 gr. |
| Eosinato do filtrado de Tribondeau e Dubreil . . . | 0,50 gr. |

Glicerina . . . . . . . . . . . . . . . . 50,0 cc.
Metanol . . . . . . . . . . . . . . . . . 50,0 cc.

O material vivo foi estudado com luz direta e também em campo escuro, bem como cinematografado em campo escuro.

As culturas deram os melhores resultados quando feitas nos meios de SIMITCH, HOGUE ou simplesmente em RINGER com 10% de sôro de cavalo.

## DESCRIÇÃO DOS ASPECTOS ENCONTRADOS

O presente trabalho não tem por objeto tratar da morfologia mais fina de *T. vitali,* sinão assentar idéias quanto á conformação geral desta espécie, em relação com a velocidade de seu desenvolvimento.

Em todas as espécies estudadas encontramos fatos absolutamente da mesma ordem; daremos figuras demonstrativas apenas de *T. vitali,* cujo estudo foi feito inicialmente, não só para não sobrecarregar inutilmente o trabalho com ilustrações, como porque das outras espécies de *Trichomas* já existem bôas figuras, que estão assinaladas na discussão do presente trabalho.

Somente as culturas de crescimento rápido tornaram possível encadear corretamente toda uma série de aspectos vistos por dezenas de pesquisadores nas espécies mais diversas do gênero *Trichomonas,* cuja interpretação, na ausência de um estudo sistematizado e, como já assinalamos, eivada de preconceitos deformantes da realidade observada, conduziu a compreensão das modificações morfológicas das espécies dêste gênero a uma situação verdadeiramente caótica.

Os aspectos encontrados são os seguintes:

A — Formas aflageladas imóveis.
B — Formas ameboides com flagelos inclusos.
  I — Imóveis.
  II — Com lobópodos curtos.
  III — Com lobópodos longos.
  IV — Com "filópodos".
C — Formas ameboides sem flagelos livres.
  I — Com membrana ondulante e lobópodos.
  II — Com membrana ondulante e "filópodos".
  III — Com membrana ondulante e axostilo.
  IV — Com "filópodos" e axostilo.
  V — Com pseudópodos, axostilo e membrana ondulante.
D — Formas flageladas propriamente ditas.
  I — Com flagelos livres e membrana ondulante.
  II — Com flagelos livres e flagelo recurrente liberado.
  III — Com flagelos livres, flagelo recurrente liberado e axostilo.
  IV — Formas tricomonadas típicas.
  V — Formas senescentes.

### A — FORMAS AFLAGELADAS IMÓVEIS

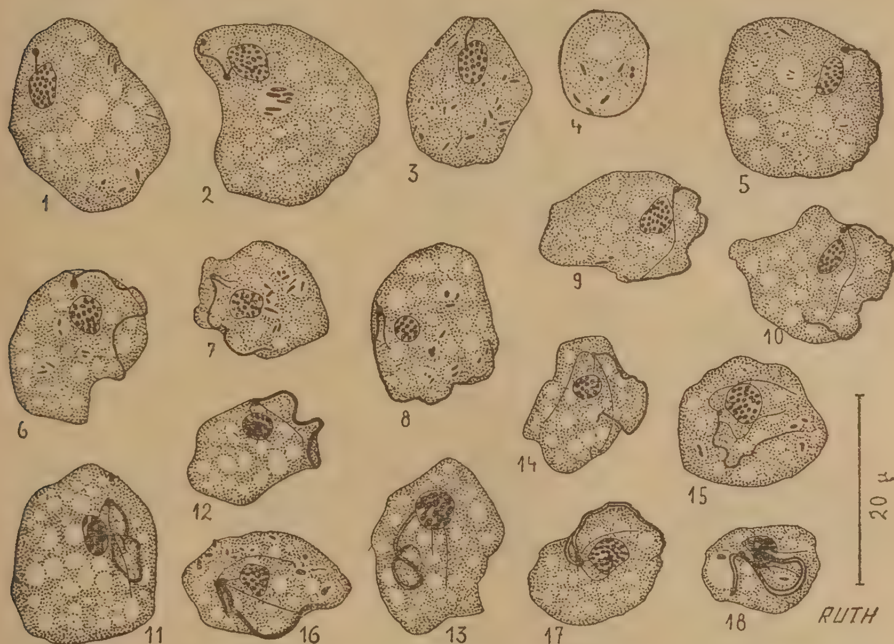
1) Material corado pelo ROMANOWSKY (Figs. 1 a 3 e Estampa 51, fig. *A*): corpos arredondados, de conformação variada, com núcleo relativamente excêntrico, cromatina em blocos ocupando toda a área nuclear; citoplasma mais compacto perifericamente, bastante vacuolar internamente, frequentemente com bacté-

rias e restos inidentificáveis nos vacúolos. Presença de blefaroplasto, ligado aparentemente ao núcleo por um rizoplasto.

2) Material vivo (Fig. 4): predominantes junto ao substrato, do 2.º ao 4.º dia, nas culturas em meio de SIMITCH, mantidas a 30ºC. Formas arredondadas, imóveis.

B — FORMAS AMEBOIDES COM FLAGELOS INCLUSOS

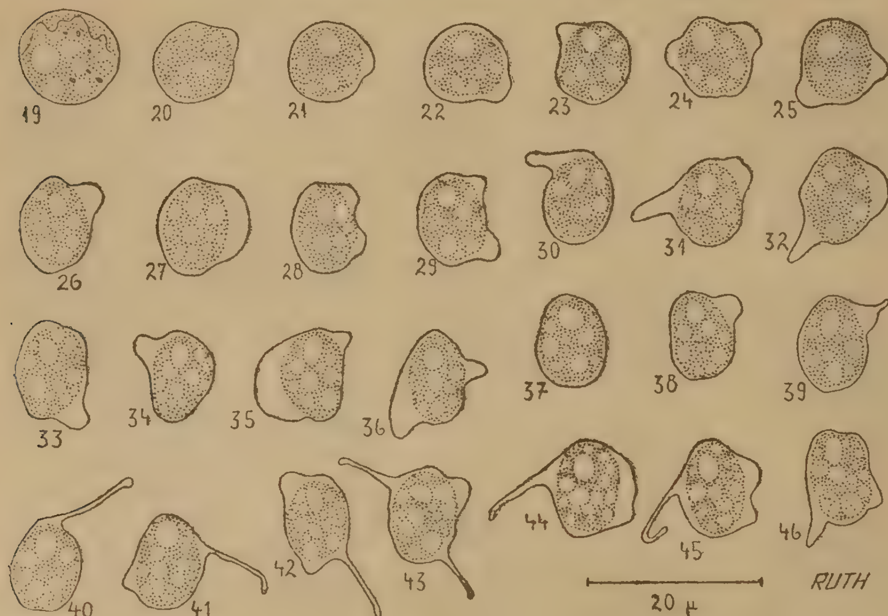
Mais abundantes junto ao substrato, do 3.º ao 6.º dia de culturas em meio de SIMITCH, mantidas a 30ºC.




*T. vitali* — Figs. 1 a 3: formas aflageladas imóveis, coradas pelo Romanowsky. (Desenhos em câmara clara). Citoplasma com numerosos vacúolos digestivos, alguns com bactérias no interior; núcleo aproximadamente ovoide, com cromatina em blocos; blefaroplasto apresentando rizoplasto que se dirige para o núcleo. A figura 2 mostra um início de divisão, já sendo encontrados dois blefaroplastos ligados entre si. Fig. 4: idem, a fresco. (Desenho em câmara clara). Vemos apenas os vacúolos digestivos no citoplasma e uma zona de refringência diferente correspondente ao núcleo. As formas aflageladas imóveis já foram consideradas como cistos, pseudo-cistos, indivíduos degenerados e como outros parasitos, representando, entretanto, formas simplificadas em virtude da rapidez das divisões. Figs. 5 a 18: formas ameboides com flagelos inclusos, coradas pelo Romanowsky.

1) Material corado pelo ROMANOWSKY (Figs. 5 a 18 e Estampas 51, figs. *B* a *D* e 52, figs. *A* e *B*): corpos arredondados, ou ligeiramente alongados, de conformação variada, núcleo com aspecto e situação semelhantes aos das formas anteriores, o mesmo podendo ser assinalado em relação ao citoplasma. Relativamente ao aparelho cinético, verifica-se com frequência a presença de um rizoplasto ligando aparentemente o blefaroplasto ao núcleo; do blefaroplasto parte um flagelo bem espêsso e longo, às vezes evidentemente dúplice, que descreve sinuosidades ora no

interior da massa citoplásmica ou então na periferia do animal; esta estrutura dará origem à membrana ondulante; em muitos exemplares, além dêste flagelo, podem ser vistas nitidamente mais uma ou duas fibras muito finas, de comprimento variável, ligeiramente arqueadas, que se dirigem do blefaroplasto para o outro polo do animal; deve ser notada ainda a presença de uma formação espêssa e relativamente curta, surgida do blefaroplasto, também exibindo às vezes estrutura dupla, de percurso aparentemente orientado pelo do formador da futura membrana ondulante.




*T. vitali* — formas ameboides com flagelos inclusos, a fresco. Fig. 19: forma imóvel. Figs. 20 a 25: com lobópodos curtos. Figs. 26 a 36: com lobópodos longos. Figs. 37 a 46: com "filópodos". (Desenhos em câmara clara). Tais formas assemelham-se a amebas, tendo sido muitas vezes consideradas como tal. Como estas, emitem pseudópodos, às vezes curtos e grossos — lobópodos —, outras vezes, mais longos e delgados — filópodos. Êsses pseudópodos são formados pelo levantamento da membrana à custa das fibras flagelares que se movem no interior do citoplasma.

E' muito provável que esta multiplicidade de aspectos morfológicos esteja, pelo menos em sua maior parte, relacionada com os quatro tipos de comportamento que vamos assinalar em seguida no mesmo material, examinado a fresco.

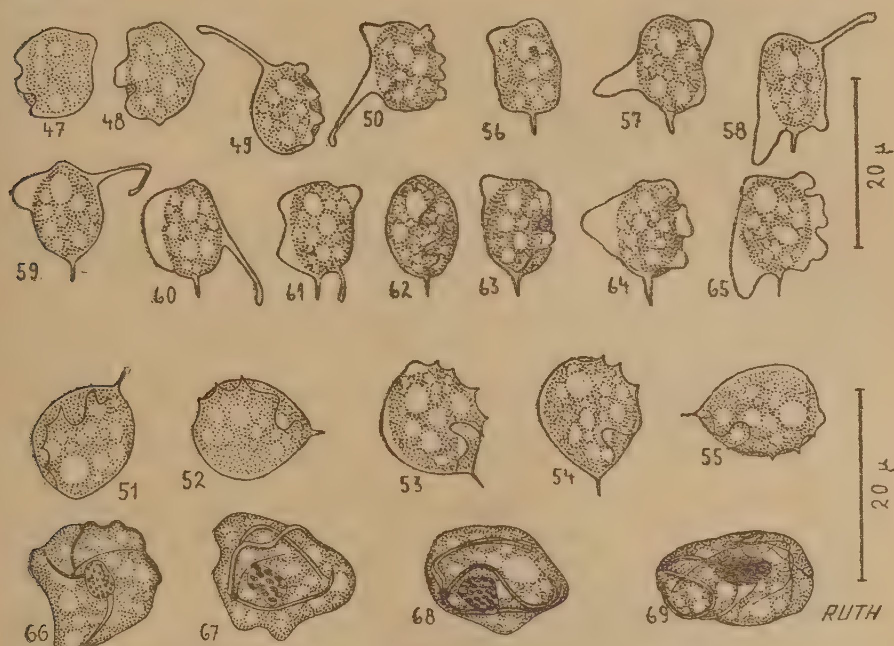
Entretanto, não foi possivel estabelecer um paralelismo preciso entre cada figura fixada e corada e seu correspondente aspecto quando vivo, não só pelas dificuldades materiais inerentes a êste gênero de trabalho, como por nem sempre poder haver uma tradução morfológica precisa para cada estado fisiológico particular.

2) Material vivo:

I — Formas imóveis (Fig. 19): arredondadas, mostrando, a um exame cuidadoso, a presença de aparentemente um flagelo, maior que o diâmetro do animal, e continuadamente agitado na massa citoplasmática, de modo a deslocar bruscamente as partículas diversas e inclusões do citoplasma.

II — Com lobópodos curtos (Figs. 20 a 25): formas arredondadas, ou ligeiramente elípticas, quasi imóveis, apresentando um lento movimento de rotação, emitindo pseudópodos curtos e largos, que ora são simplesmente retraídos, outras vezes deslocados sôbre a superfície do animal.

III — Com lobópodos longos (Figs. 26 a 36): mesmo comportamento geral que as primeiras, emitindo porém lobópodos mais longos que os das formas anteriores.




*T. vitali* — formas ameboides sem flagelos livres, a fresco. Figs. 47 e 48: com membrana ondulante e lobópodos. Figs. 49 e 50: com membrana ondulante e "filópodos". Figs. 51 a 55: com membrana ondulante e axostilo. Figs. 56 a 61: com "filópodos" e axostilo. Figs. 62 a 65: com pseudópodos, axostilo e membrana ondulante. Figs. 66 a 69: formas ameboides sem flagelos livres, com axostilo, coradas pelo Romanowsky. (Desenhos em câmara clara). Estas formas sem flagelos livres, porém, já com a membrana ondulante individualizada, lembram amebas onde além da emissão de pseudópodos há o undular permanente de uma parte de seu contôrno.

IV — Com "filópodos" (Figs. 37 a 46): formas arredondadas, ainda pouco móveis, podendo porém deslocar-se mais que as formas com lobópodos, tendo o movimento de rotação menos acentuado; emitem pseudópodos digitiformes, cujo comportamento não pode ser melhor descrito que com as palavras de Dobell e O'Connor (1921, pag. 69): "Degenerating "amoeboid" forms of *Trichomonas* are commonly seen in the stools. The organism loses its flagella and other organs, and then — without undergoing any appreciable locomotion — shows a series of curious change of shape. A rapid ondulation of a part of the surface is all that may be seen: but frequently a finger-like "pseudopodium" is thrust out at the anterior end, passes along the body towards the hinder extremity and is finally drawn into the protoplasm in this region. The whole process may be repeated again and

again for hours — or even days. Such degenerating individuals are very characteristic of *Trichomonas* and do not really show much ressemblance to amoebae".

### C — FORMAS AMEBOIDES SEM FLAGELOS LIVRES

Mais frequentes junto ao substrato, do 4.º ao 7.º dia, nas culturas em meio de SIMITCH, mantidas a 30º C.

1) Material corado pelo ROMANOWSKY (Figs. 66 a 69 e Estampa 53, figs. *A* e *B*): o aspecto muitas vezes não difere do descrito para as formas anteriores, pois o fato de individualizar-se a membrana ondulante não é morfologicamente representável, em relação à simples existência do flagelo correspondente, antes dêste soldar-se ao periplasto do animal; o aumento da complexidade estrutural só é dado pelo aparecimento do axostilo, pouco saliente externamente, e que será descrito mais em detalhe, no estudo das formas flageladas.

2) Material vivo:

I — Com membrana ondulante e lobópodos (Figs. 47 e 48): formas de comportamento semelhante às de B, II e III, apresentando a mais uma membrana ondulante individualizada.

II — Com membrana ondulante e "filópodos" (Figs. 49 e 50): formas de comportamento semelhante às de B, IV, apresentando a mais uma membrana ondulante individualizada.

III — Com membrana ondulante e axostilo (Figs. 51 a 55): corpo piriforme e polo posterior exibindo a extremidade livre de um axostilo; movimento de rotação, dado pela membrana ondulante, que acompanha um dos meridianos do corpo.

IV — Com "filópodos" e axostilo (Figs. 56 a 61): corpo piriforme, com axostilo saliente no polo posterior. Sem membrana ondulante, exibindo expansões alongadas e finas como as assinaladas em B, IV, devido a um retardo na individualização da membrana ondulante e na exteriorização dos flagelos.

V — Com pseudópodos, axostilo e membrana ondulante (Figs. 62 a 65): semelhantes às formas precedentes, diferem delas pela existência de uma membrana ondulante individualizada.

### D — FORMAS FLAGELADAS PROPRIAMENTE DITAS

Começam a aparecer na parte líquida do meio desde o quarto dia da cultura a 30ºC., vão aumentando gradativamente, para tornarem-se as únicas existentes, a partir do oitavo dia.

1) Material corado pelo ROMANOWSKY:

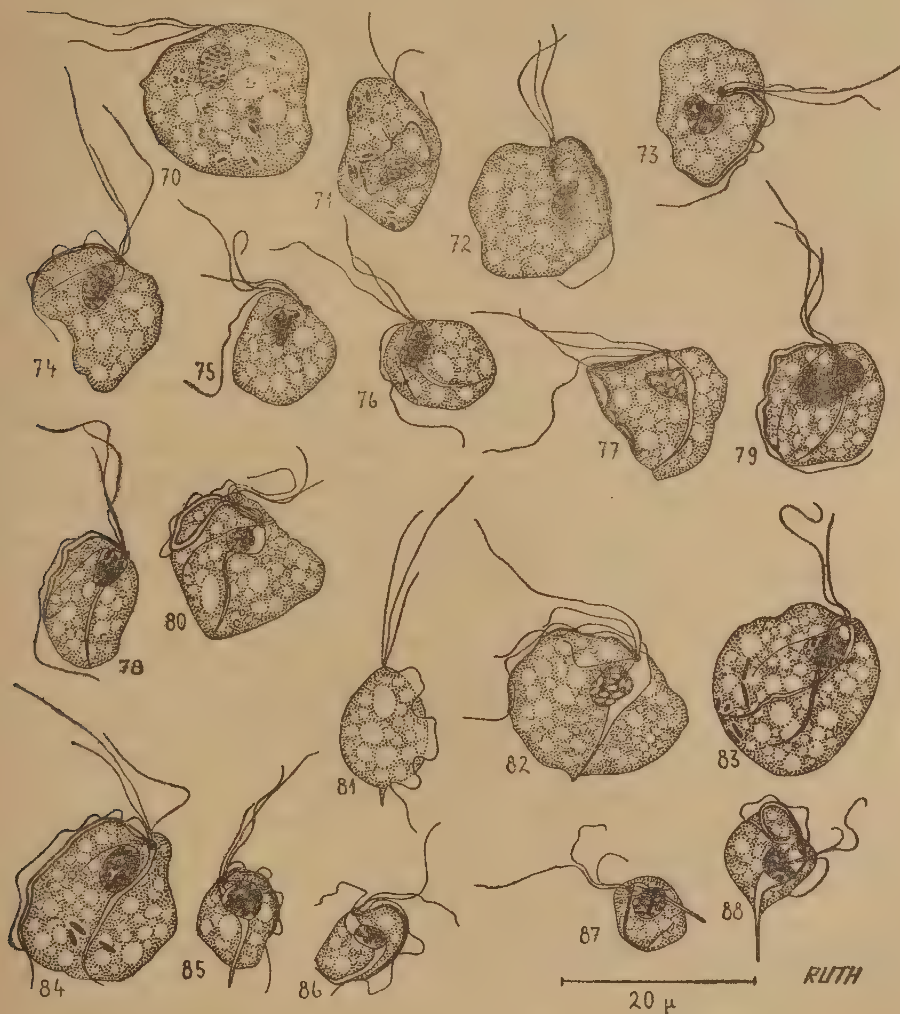
I — Com flagelos livres e membrana ondulante (Figs. 70 a 74 e Estampa 53, fig. *B*): apresentam a estrutura de um *Trichomonas*, excepto a presença de axostilo.

II — Com flagelos livres e flagelo recurrente liberado (Fig. 75): semelhante à forma anterior, mas apresentando um verdadeiro descolamento do flagelo recurrente, que fica dêste modo separado da membrana ondulante.

III — Com flagelos livres, flagelo recurrente liberado e axostilo (Figs. 76 a 78 e Estampa 54, figs. *A* e *B*): seria a forma anterior, tornada mais complexa pelo aparecimento de um axostilo.

IV — Formas tricomonadas típicas (Figs. 79 e 80 e Estampa 54, figs. *C* e *D*): flagelados de contôrno predominantemente ovoide, às vezes piriforme. Nas culturas velhas encontram-se exemplares gigantes ao lado de outros, anões.

Citoplasma: vacuolar em sua porção central, homogêneo perifericamente, vacúolos frequentemente com bactérias. Em nosso material tivemos a oportunidade de verificar que aquilo a que os diversos autores chamam de citofaringe




*T. vitali* — formas flageladas propriamente ditas, coradas pelo Romanowsky. Figs. 70 a 74: com flagelos livres e membrana ondulante. Fig. 75: com flagelos livres e flagelo recurrente liberado. Figs. 76 a 78: com flagelos livres, flagelo recurrente liberado e axostilo. Figs. 79 e 80: formas tricomonadas típicas. Fig. 81: idem, a fresco. Figs. 82 a 88: formas senescentes, coradas pelo Romanowsky. (Desenhos em câmara clara).

corresponde realmente à porção juxtablefaroplástica do axostilo. Não encontramos citofaringe em nenhuma das espécies estudadas.

Aparelho cinético: blefaroplasto constituido aparentemente por 2 grânulos próximos, situados no polo anterior do animal, dando origem a 3 sistemas de fibras: a) — flagelo recurrente e costa, formadores da membrana ondulante, originando-se de um dos grânulos do blefaroplasto, sendo o primeiro sistema a individualizar-se; b) — flagelos livres originando-se do outro grânulo do blefaroplasto; c) — axostilo, formado pela participação de elementos provenientes dos dois grânulos do blefaroplasto, dirige-se para trás, sofre brusca inflexão ao nivel do núcleo, onde se alarga muito e torna-se menos corável, para retomar em seguida sua direção ântero-posterior, estreitando-se cada vez mais à medida que se aproxima do polo posterior do animal; nas formas mais novas o axostilo tende a permanecer incluso, ao passo que nas mais velhas êle salienta cada vez mais para o exterior, apresentando mesmo tendência a se tornar exageradamente proeminente nas formas senescentes.

Núcleo: arredondado, alongado ou ovoide, completamente tomado pela cromatina, que se dispõe em grânulos juxtapostos. Deixamos o estudo do núcleo em movimento para outro trabalho.

V — Formas senescentes (Figs. 82 a 88 e Estampa 53, figs. *C* e *D*): diferem das formas anteriores não só por apresentarem dimensões extremas, isto é, indivíduos gigantes e anões, como ainda por parecerem mais rígidas, o que provavelmente decorre de um certo grau de deshidratação; nota-se ainda, o que deve ser consequência de tal fato, uma tendência à redução do maior diâmetro do corpo, em virtude do que o axostilo passa a salientar-se exageradamente. Mais características são as formas anãs, que adquirem afinidades corantes acidófilas, tornando-se ao mesmo tempo sua membrana ondulante extremamente larga e com muito poucas sinuosidades.

2) Material vivo (Fig. 81): são formas muito ágeis, com os movimentos típicos de *Trichomonas*, muito deformáveis, apresentando acentuada metabolia, o que lhes permite insinuar-se facilmente pelos desvãos que encontram entre as partículas do meio; são as únicas encontráveis nas culturas velhas de crescimento rápido ou, então, nas de crescimento lento. Deslocam-se saltitando irregularmente, à custa das chicotadas dos seus flagelos livres, ao passo que a membrana ondulante, quando existente, é percorrida por ondas sucessivas e regulares de estímulos anteroposteriores, que tendem a imprimir ao animal um movimento rotatário, perturbado na sua regularidade pela agitação dos flagelos livres.

A locomoção dêstes flagelados é pouco eficiente, pois seu aparelho cinético parece mais adequado a produzir a agitação do corpo, do que deslocamento no espaço em direção determinada.

Nas culturas velhas surgem as verdadeiras formas de degeneração, ou melhor, de senescência do animal, caracterizadas por um aumento da viscosidade do citoplasma, isto é, por maior rigidez do corpo, dimensões avantajadas e, principalmente, grande alongamento da porção livre do axostilo, que pode tornar-se excessivamente saliente.

Examinando *T. vitali* em cultura de 5 dias em meio de SIMITCH, mantidas a 30º C., tivemos oportunidade de encontrar formas ameboides abundantes como de costume. Nossa atenção foi porém chamada para uma forma com "filópodos",

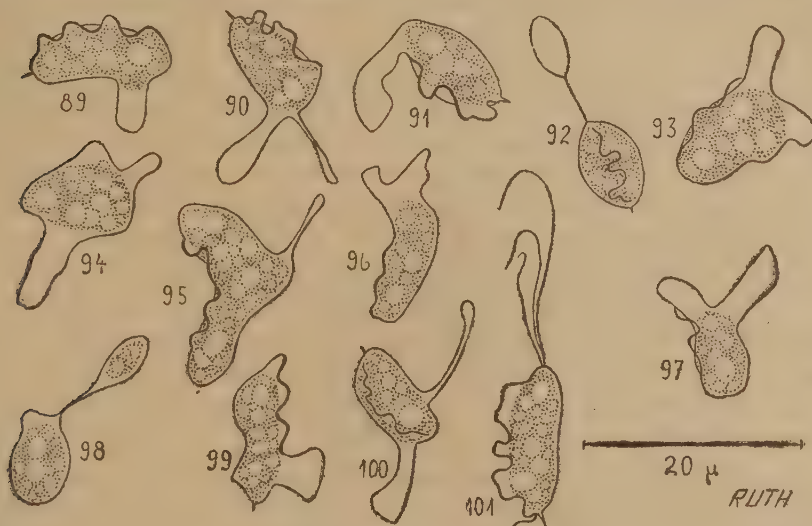
axostilo e membrana ondulante (= C, V), que apresentava pseudópodos abundantes e de deslocamento rápido pelo corpo, tomando o animal os mais variados aspectos.

Os movimentos foram-se tornando sucessivamente mais complexos (Figs. 89 a 101) até que, depois de meia hora aproximadamente, os flagelos tornaram-se livres de um momento para outro e o *Trichomonas* passou a apresentar movimentos típicos, isto é, cessaram as grandes deformações do corpo e iniciou-se o deslocamento longitudinal.

Em *T. muris* foi observado fato semelhante com uma forma ameboide que, após 4 horas de exame, passou a apresentar flagelos livres.

Verificamos assim, o fato da passagem de formas ameboides para formas flageladas propriamente ditas.

VI — Formas agônicas: no decorrer dos exames de longa duração, assim como durante as filmagens, é possivel verificar que formas flageladas, sob a ação




*T. vitali* — a fresco. Figs. 89 a 101: aspectos da transformação de forma ameboide sem flagelos livres em forma tricomonada típica. (Desenhos em câmara clara).

do calor, podem, ao fim de certo tempo, morrer, sendo êste fenômeno assinalado inicialmente por uma redução na velocidade do movimento flagelar, depois por coalescência dos flagelos anteriores em um feixe único e espêsso; êste continua a agitar-se lentamente, aderindo por certo tempo e tornando a desprender-se do corpo do protozoário e, à medida que o processo se acentua, as adesões vão se tornando cada vez mais persistentes, até a coalescência final do feixe flagelar com o corpo do flagelado. A membrana ondulante continua a mover-se por mais algum tempo cada vez com menor intensidade e com individualidade morfológica cada vez menos acentuada. Finalmente resulta uma verdadeira forma discretamente ameboide, apresentando ligeira metabolia, que diminue gradativamente até a morte do protozoário, cujo cadáver assume forma aproximadamente esférica. Êste processo pôde ser muito bem observado e registrado cinematograficamente.

## DISCUSSÃO

A série de modificações morfológicas por nós verificada nas várias espécies do gênero *Trichomonas* com que tivemos a oportunidade de trabalhar, nas diferentes condições de experiência em que foram colocadas, permite-nos relacioná-la com a grande soma de observações de muitos pesquisadores que se ocuparam do assunto.

Deixamos de discutir, por supérfluo no estado atual dos conhecimentos sobre o assunto, as referências à admitida intercalação de espécies de *Blastocystis* no ciclo evolutivo das espécies de *Trichomonas*, como quizeram PERRONCITO (1888), SCHAUDINN (1903), PROWAZEK (1904), UCKE (1908), PROWAZEK (1908), BOHNE e PROWAZEK (1908), BENSEN (1910), WENYON (1910), LYNCH (1915), BARLOW (1916) e MENZANI (1933 e 1939), bem como as confusões com cistos de outros protozoários concomitantes, como aconteceu com GALLI-VALERIO (1900 e 1904), PROWAZEK (1904), DOBELL (1909), ALEXEIEFF (1914), LYNCH (1916) e ESCOMEL (1913). Êste ultimo faz um relato de fatos inteiramente incompreensíveis, a começar pelas disenterias por *Trichomonas* e pelo encontro dêstes flagelados em reservatório de água potável em Arequipa, bem como suas culturas feitas em um caldo de alface, com o aparecimento exclusivo de cistos, e ainda divisão e rompimento dêstes, com libertação de novos *Trichomonas*. E' dificil saber-se até que ponto êste autor trabalhou realmente com *Trichomonas*.

As manifestações gâmicas ligadas ao pretenso fenômeno do encistamento, tais como foram referidas por SCHAUDINN (1903), PROWAZEK (1904 e 1908), BOHNE e PROWAZEK (1908), UCKE (1908) e BENZEN (1910), não foram confirmadas posteriormente, nem verificamos qualquer evidência a tal respeito.

A existência de formas ameboides nas espécies do gênero *Trichomonas* foi notada por muitos pesquisadores, embora nem sempre reconhecidas como tais, por serem frequentemente meros achados em esfregaços fixados e corados.

### PRETENSOS ENCISTAMENTOS

Tais formas foram quasi sempre ligadas a processos de encistamento.

As referências mais numerosas são encontradas a respeito de *T. hominis:* para SCHAUDINN (1903), as formas ameboides unir-se-iam para se transformarem em cistos; BENZEN (1910) descreve formas ameboides que degenerariam, transformando-se em cistos, o que também teria verificado para *T. vaginalis;* BARLOW (1916) também cita formas ameboides como precursoras do aparecimento de cistos, assinalando o mesmo facto em *T. vaginalis;* CHATTON (1918) refere-se ao encontro de formas ameboides móveis, que êle vestia com uma casca hialina, só tendo estudado material vivo; SCHMID e KAMNIKER (1926) a propósito de *T. vaginalis*, só observaram material corado, referindo-se a formas resistentes ou cistos onde exis-

tem flagelos, podendo estar ou não presente a membrana ondulante; WENRICH (1931 e 1939) diz que os indivíduos em degenerescência tornam-se ameboides ou se arredondam, tomando a forma de esferas pseudo-císticas; PENSO (1932) descreve muito bem, sem figurá-las, formas ameboides de *T. hominis*, que interpreta como cistos, somente em material fixado e corado; BLAND, GOLDSTEIN, WENRICH e WEINER (1932) notaram, em *T. vaginalis*, tanto em culturas como em material de vagina, a existencia de "pseudo-cistos" talvês representando um resto atávico de seus remotos antecessores que seriam capazes de formar cistos verdadeiros e resistentes; esta explicação peca por não ter fundamento biológico algum; POWELL (1936) diz que em preparações a fresco de *T. vaginalis* aparecem "pseudocistos" que representam, provavelmente, indivíduos moribundos, uns e massas degeneradas de citoplasma, resultantes de uma pretensa autotomia, outros.

Menção especial merece o trabalho de BOYD (1919), único autor que refere observações feitas em culturas, nas quais notou às vezes predomínio absoluto de formas não flageladas, cujo comportamento descreve muito bem, só não tendo acertado na interpretação exata de tal fenômeno, por se achar muito preocupado com a necessidade de encontrar cistos, denominando tais formas "precísticas", quando vistas a fresco, embora não conseguisse imagens de material fixado e corado que emprestassem o necessário apôio à sua interpretação.

Nossos achados de formas ameboides de *T. hominis* em fezes humanas diarreicas coincidem com as descrições dos autores assinalados, só sendo possivel sua interpretação através do comportamento das culturas, que mostraram muito bem as bases cronológicas do modo de encarar tal fenômeno.

Em *T. muris*, PROWAZEK (1904) refere tais formas, interpretando-as nos mesmos moldes de SCHAUDINN (1903); WENYON (1907) mostra-se muito cauteloso a tal respeito, pois não pôde encontrar membrana cística perfeitamente diferenciada nas formas ameboides que viu em fezes de camondongo; BRUG (1917) descreve cistos incontestáveis no dizer de GRASSÉ (1926); CHATTON (1918) assinala fenômenos da mesma ordem que os que vira em *T. hominis;* MEYER (1920) descreve impecavelmente formas ameboides que interpreta como verdadeiros cistos; WENRICH (1921) assinala formas ameboides a que considera, de acôrdo com a citação de BISHOP (1931), resistentes; GWÉLÉSSIANY (1929) mostra bons desenhos de formas ameboides, atribuindo natureza de membrana mucilaginosa a evidentes figuras de retração do material, provocadas pelo fixador empregado, membrana essa que lhe pareceu indispensável para completar o conceito de cistos e pseudocistos, aplicado a tais formas.

Nossas observações feitas em *T. muris*, tanto em material de intestino de rato como em culturas, mostram que os fatos se superpõem perfeitamente aos já assinalados, não necessitando considerações especiais.

Em *T. caviae*, KUCZYNSKI (1914), BRUG (1917), WENYON (1926) e LYNCH (1930), descrevem cistos, que não são outra cousa sinão formas ameboides, como verificamos no exame do material de cobaias, o que também não exige referência especial.

KUCZYNSKI (1914) descreveu cistos em *T. augusta* ALEXEIEFF, 1911, cuja significação não foge à interpretação dada por nós.

Em *T. batrachorum* PERTY, 1852, temos as observações de GRASSÉ (1926), que estudou bem suas formas ameboides, considerando-as como cistos, embora sejam talvês muito subjetivas suas referências à eliminação do axostilo e ao mecanismo de desaparição dos flagelos.

Em *T. myoxi*, do intestino de *Myoxus quercinus*, GALLI VALERIO (1927) considera formas imóveis como cistos.

Em *Trichomonas* de aves, formas ameboides no intestino foram vistas por FANTHAN (1910), em *Lagopus scoticus*, referindo-se a cistos; por O. DA FONSECA (1920), em galinhas, denominando-as "formas quistoides" e por TANABE (1926) também em galinhas. Êste último dá figuras de tais formas sem se referir a elas no texto.

### PRETENSAS DEGENERAÇÕES

As interpretações de formas emeboides, como sendo aspectos de degeneração em *Trichomonas*, são em número mais restrito.

DONNÉ (1837) e KUNSTLER (1884) já assinalam a existencia de formas ameboides em *T. vaginalis*, segundo citação de WENRICH (1939); MARCHAND (1894) encontrou formas ameboides de *T. vaginalis* na urina de um homem e as considerou como degeneradas; BENZEN (1910) refere êste facto para *T. hominis* e *T. vaginalis*, embora de maneira obscura, pois seus cistos (=*Blastocystis*), seriam produtos da degeneração de formas ameboides; WENYON (1915 e 1926) descreve muito bem tais formas em *T. hominis*, encontradas em fezes, bem como WENYON e O'CONNOR (1917); GOODEY (1917) encontrou formas flageladas apresentando pseudópodos que êle julga serem característicos da degeneração; DOBELL e O'CONNOR (1921) descrevem admiravelmente as formas ameboides no mesmo material, em exame a fresco, tanto que pudemos aproveitar suas palavras na descrição dos nossos factos; WENRICH (1931 e 1939) refere-se também às formas ameboides de *T. vaginalis* considerando-as como degeneradas.

Nos *Trichomonas* de aves, FANTHAN (1910) em *Lagopus scoticus*, acha que as formas flageladas que não se transformam em "cistos" dão formas degeneradas, embora não se possam distinguir os limites dos dois conceitos; em galinhas, MARTIN e ROBERTSON (1911) são ainda mais obscuros, pois denominam as formas ameboides "degenerating dividing forms" admitindo que o fenômeno possa complicar-se com um possivel processo de conjugação, que não é demonstrado.

Em anfíbios, temos a observação de BISHOP (1931) para *T. batrachorum*, negando a possibilidade de encontrarem-se cistos, tanto nas fezes como nas culturas e aludindo rapidamente às formas ameboides, como sendo de natureza degenerativa; em *T. vitali*, os desenhos que acompanham a descrição original de espécie assinalam uma forma ameboide, que não foi interpretada.

### ASPECTOS EM LESÕES

Outro aspecto do problema, ainda perfeitamente dentro da interpretação dada por nós, é o achado de formas ameboides de *Trichomonas* ligadas a processos mórbidos.

Deixamos de lado as observações relativas a *T. hominis*, por já terem sido discutidas de outros pontos de vista, para citar as observações de MENZANI (1933 e 1939) em peruzinhos com êntero-hepatite, dando o autor excelentes ilustrações das formas ameboides de um *Trichomonas* que encontrou nessas condições, sendo lamentável apenas que insistisse em considerá-las como transição entre formas flageladas de *Trichomonas* e aqueles perturbadores representantes do reino vegetal, já ha tanto tempo incluídos no gênero *Blastocystis*.

Tais achados coincidem com as observações inéditas de C. Pereira e P. Nobrega, que viram predominarem formas ameboides em lesões pseudocruposas da abóbaba palatina e faringe de borrachos, bem como em lesões semelhantes do esôfago de pintos, associadas à presença de *Trichomonas*.

### MODIFICAÇÕES AGÔNICAS

O estudo das modificações agônicas em *Trichomonas* veiu confirmar uma série de observações bem registradas sôbre o mesmo fenômeno. Braun e Seifert (1915 e 1916) dizem que *Trichomonas* obtidos de fezes humanas, depois de algum tempo, perdem os flagelos e a membrana ondulante, tornando-se ameboides, movendo-se como amebas; Davis (1929) observou que *T. vaginalis* mortos experimentalmente pelo calor (46°C. por 10 min.) tornam-se redondos ou ligeiramente ovais; Bland, Goldstein e Wenrich (1931), trabalhando com *T. vaginalis*, dizem que durante a observação contínua sôbre lâmina os flagelados tornam-se redondos, simulando eventualmente um cisto, outras vezes aparecem extensões pseudopodiais, tomando uma aparencia distintamente ameboide.

## CAUSAS DE ÊRRO

O fato de tantos pesquisadores, geralmente competentes, terem visto formas ameboides em espécies as mais variadas do gênero *Trichomonas*, errando entretanto na sua interpretação, deve decorrer de:

1) Preconceito da existência de cisto. — Realmente, a noção de que um protozoário intestinal, que não possue vector e portanto teria que expor-se necessariamente aos insultos do meio exterior, ao passar de um hospedeiro para outro, é tão corrente e tão bem apoiada em exemplos, que justifica perfeitamente a apreciável quantidade de energia dispendida na procura de cistos em espécies de *Trichomonas*, levando a grande maioria dos pesquisadores a procurar adaptar os fatos de observação às suas próprias idéias.

2) Abuso do emprêgo de esfregaços fixados e corados, feitos diretamente com material do hospedeiro. — Nestas condições, torna-se difícil encontrar um nexo entre as diferentes formas observadas, sendo mais frequente a tendência a considerar "bem conservadas" as imagens mais relacionadas com as figuras clássicas dos tratados, embora tais figuras nem sempre correspondam com exatidão científica ao aspecto do material, ora por serem feitas a mão livre, sem o freio à imaginação, constituido pelos aparelhos de desenhar ou câmaras fotográficas, ora por comporem resultados finais derivados da superposição de imagens complementares colhidas em mais de um espécime do material examinado, ou ainda em virtude de serem feitas por desenhistas excessivamente "habeis". Assim sendo, toda forma atípica será interpretada necessariamente como não bem fixada, ou mal corada e, se fôr muito frequente, "degenerada".

3) Fanatismo pelas lacas ferrosas dos derivados da hematoxilina. — Tais lacas, que são preciosas no estudo da cromatina e dos grânulos do aparelho cinético, são muito mais usadas que compreendidas, no mecanismo de sua ação, pois só a custo da nitidez de outras estruturas do animal é que podem impregnar bem o aparelho cinético. Os corantes do tipo ROMANOWSKY dão resultados de conjunto muito mais claros e seguros.

4) Pouco emprêgo de culturas. — Como as formas ameboides constituem um índice de velocidade do desenvolvimento das espécies de *Trichomonas*, o emprêgo dos metodos culturais é o mais adequado para pôr o fenômeno em evidência, pois, como já tinha sido assinalado por BOYD (1919), torna-se possivel, nos primeiros dias das culturas, em meios para crescimento rápido, terem-se, exclusivamente ou quasi, formas ameboides, ao passo que, como o demonstramos, quando o crescimento cultural se vai atenuando, passam a predominar as formas flageladas.

5) Tratamento excessivamente bacteriológico das culturas. — Considerando-se a facilidade que existe em cultivarem-se tais flagelados, é necessário fazer-se a ressalva de que as culturas têm sido empregadas quasi exclusivamente para fins diagnósticos, ou outros que não os de servirem para melhor análise da morfologia funcional dêstes protozoários. E' necessário não perder de vista o fato de existir, no estudo de culturas de organismos possuidores de morfologia complexa, alguma cousa além de vêr se crescem bem ou mal, depressa ou devagar, fermentando isto ou aquilo.

## ON THE TRUE NATURE OF THE "AMOEBOID FORMS", OF THE SO CALLED "CYSTS" AND "DEGENERATING FORMS" IN THE GENUS "TRICHOMONAS DONNÉ, 1836"


### *Abstract*

*1 — Careful revision of the bibliography dealing with the presence of "cysts" and "degenerating forms" in the genus Trichomonas is made.*

*2 — These concepts were always in correspondence to or intangled with amoeboid forms in these flagellates.*

*3 — This study was performed on T. vitali* PINTO & F. DA FONSECA, 1926 (=*T. boae* REICHENOW, 1929), *T. muris* (GRASSI, 1879), *T. caviae* DAVAINE, 1875, *T. hominis* (DAVAINE, 1860), *both in cultures and in faeces of the hosts. Trichomonads were also seen in pseudocrupous lesions in the throat of young pigeons and in similar lesions in the oesophagus of chickens.*

*4 — The amoeboid forms are not at all related with encystation (otherwise, not existing) nor with degeneration, a completely diverse phenomenon.*

*5 — This work, perfomed principally with culture studies, shows that amoeboid forms appeared always as the flagellate was put in stimulating conditions for its multiplication, this really meaning higher vitality.*

*6 — In the course of the rapidly growing cultures in* SIMITCH *medium, the following morpho-physiological types of Trichomonas were found: A — non-flagellate, non-motile forms; B — amoeboid forms with enclosed flagella — I) non-motile, II) with short lobopodia, III) with long lobopodia, IV) with "filopodia"; C — amoeboid forms without free flagella — I) with ondulating membrane and lobopodia, II) with ondulating membrane and "filopodia", III) with ondulating membrane and axostyle, IV) with "filopodia" and axostyle, V) idem, with ondulating membrane; D — true flagellate forms — I) with free flagella and ondulating membrane, II) with free flagella and released trailing flagellum, III) idem, with axostyle, IV) typical trichomonad forms, V) senescent forms.*

*7 — Reference is made to the predominance of amoeboid forms in the lesions associated with Trichomonas, as was well seen by* C. PEREIRA & P. NOBREGA *(unpublished results) in the throat of young pigeons and oesophagus of chickens.*

*8 — Attention is called to the danger of the amoeboid forms of Trichomonas being confused, in superficial examination, with pathogenic entamoebae, both in diarrhoeic faeces and on the first days of the* SIMITCH *cultures.*

*9 — The main probable causes of error responsible for the longtime misinterpretation of the amoeboid forms in Trichomonas, are the following: a) cyst-existence prejudice; b) abuse of fixed and stained smears employment, directly from the host; c) fanatism to the ferrous laques of haematoxylin derivates; d) small use of cultures methods; e) excessively bacteriological treatment of the cultures, when employed.*

## BIBLIOGRAFIA

ALEXEIEFF, A. — 1911 — Sur la nature des formations dites "kystes" de Trichomonas intestinalis. *C. R. Soc. Biol.*, 71, 296-299.

ALEXEIEFF, A. (*) — 1911 — Sur les kystes de Trichomonas intestinalis dans l'intestin de batraciens. *Bull. Sci. Franc. Belg.*, 44, (4).

ALEXEIEFF, A. — 1914 — Notes protistologiques. *Zool. Anz.*, 43, 515-524.

BARLOW, N. — 1916 — Studies on Trichomonas. *New Orleans Med. Surg. J.*, 69, 299-307.

BENZEN, W. — 1910 — Untersuchungen über Trichomonas intestinalis und T. vaginalis des Menschen. *Arch. f. Protistenk.*, 18, 115-127.

BISHOP, A — 1931 — A description of Embadomonas n. spp. from Blatta orientalis, Rana temporaria, Bufo vulgaris, Salamandra maculosa; with a note upon the "cyst" of Trichomonas batrachorum. *Parasit.*, 23, 286-300.

BLAND, P. B., GOLDSTEIN, L. e WENRICH, D. H. — 1931 — Vaginal trichomoniasis in the pregnant woman: a clinical and morphologic study. *J. Am. Med. Ass.*, 96, 157-163.

BLAND, P. B., GOLDSTEIN, L., WENRICH, D. H. e WEINER, E. — 1932 — Studies on the Biology of Trichomonas vaginalis. *Am. J. Hyg.*, 16, 492-512.

BOHNE, A. e PROWAZEK, S. v. — 1908 — Zur Frage der Flagellatendysenterie. *Arch. f. Protistenk.*, 12, 1-8.

BOYD, M. F. — 1919 — Observations on Trichomonas intestinalis in vitro. *J. Parasit.*, 5, (3), 132-136.

BRAUN, M. G. C. C. e SEIFERT, O. — 1915-1916 — Die tierischen Parasiten des Menschen, die von ihnen hervorgerufenen Erkrankungen und ihre Heilung. WÜRZBURG, C. KABIZCH., Vol. I, 81 e 83.

BRUG, S. L. (*) — 1917 — Trichomonascysten. *Geneesk. Tydschr. v. Nederl. Indie*, 57, 347.

CASTELLANI, A. — 1905 — Observations on some Protozoa found in human faeces. *Centralbl. f. Bakt. I. (Orig.)*, 38, 66-69.

CHATTON, E. (*) — 1918 — Flore et faune intestinales observées au Laboratoire militaire de bactériologie au Sud-Tunisien (à GABÉS). *Arch. Inst. Pasteur* de *Tunis*, 10, 205-220.

DAVIS, C. H. — 1929 — Trichomonas vaginalis DONNÉ. Second report of experimental and clinical observations. *Am. J. Obst. and Gyn.*, 18, 575-580.

DOBELL, C. — 1909 — Researches on the intestinal Protozoa of frogs and toads. *Quart. J. Microscop. Sc.*, 53, 201-277.

DOBELL, C. e O'CONNOR, F. W. — 1921 — The intestinal Protozoa of Man. London, 65-70.

DOFLEIN, F. e REICHENOW, E. — 1929 — Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena, 641 e 654.

ESCOMEL, E. — 1913 — Sur la dysenterie à Arequipa (Pérou). *Bull. Soc. Path. exot.*, 6, 120-122.

FANTHAM, H. B. — 1910 — Observations on the Parasitic Protozoa of the Red Grouse (Lagopus scoticus), with a Note on the Grouse Fly. *Proc. Zool. Soc. London*, 2, 692-708.

FONSECA, O. DA — 1920 — Estudos sobre os Flagelados parasitos. *Mem. I. Osw. Cruz*, 12, 51-65.

GALLI-VALERIO, B. — 1900 — Notes de Parasitologie. *Centralbl. f. Bakt. I. (Orig.)*, 27, 305-309.

GALLI-VALERIO, B. — 1904 — Notes de Parasitologie. *Ibid.*, 35, 81-91.

GALLI-VALERIO, B. — 1927 — Notes de parasitologie et de technique parasitologique. *Centralbl. f. Bakt.*, Jena. *I. (Orig.)*, 103, 4-5, 177-182.

GOODEY, T. — 1917 — A note on the trichomonad flagellate Tetratrichomonas buccalis n. sp. *in* T. GOODEY and A. W. WELLINGS. — Observations on Entamoeba gingivalis from the human mouth, with a note on the trichomonad flagellate Tetratrichomonas buccalis n. sp. *Parasit.*, 9, 554-559.

GRASSÉ, P. P. — 1926 — Contribution à l'étude de Flagellés parasites. *Arch. Zool. exp. gén.*, 65, 345-602.

GWÉLÉSSIANY, J. — 1929 — Sur l'enkystement chez le Trichomonas du rat. *Ibid. (Notes & Revue)*, 69, 64-68.

KUCZYNSKI, M. H. — 1914 — Untersuchungen an Trichomonaden. *Arch. f. Protistenk.*, 33, 119-204.

KUNSTLER J. — 1884 — Trichomonas vaginalis. *J. de Micrographie*, 8, 317-331.

LAMBL, W. (*) — 1860 — Beobachtungen und Studien aus dem Gebiete der pathologischen Anatomie und Histologie. (LOESCHNER u. LAMBL) *Aus dem Franz-Josef-Kinder-Spitale in Prag. I. Theil, sect.* 13, (6), *"Zur Pathologie des Darmes"*, 365.

LYNCH, K. M. — 1915 — Trichomoniasis of Vagina and Mouth. *Am. J. Trop. Diseases and Prev. Med.*, 2, 231-233.

LYNCH, K. M. — 1916 — Dauercystoformation of Trichomonas intestinalis. *J. Parasit.*, 3, (1), 28-33.

LYNCH, K. M. — 1922 — Cultivation of Trichomonas and the question of differenciation of flagellates. *J. M. Med. Ass.*, 79, 1130-1133.

LYNCH, K. M. — 1930 — Protozoan parasitism of the alimentary tract. Pathology, Diagnosis and Treatment. New York, 16, 18 e 149.

MARCHAND, F. — 1894 — Über das Vorkommen von Trichomonas im Harne eines Mannes, nebst Bemerkungen über Trichomonas vaginalis. *Centralbl. f. Bakt. I. (Orig.)*, 15, 709-720, Pl. III.

MARTIN, C. H. e ROBERTSON, M. — 1911 — Further Observations on the Caecal Parasites of Fowls, with some Reference to the Rectal Fauna of other Vertebrates. *Quart. J. Microscop. Sc.*, 57, 53-81.

MAYER, M. — 1920 — Zur Cystenbildung von Trichomonas muris. *Arch. f. Protistenk.*, 40, 290-294.

MENZANI, C. — 1933 — Osservazioni e ricerche su l'entero-epatite infettiva dei tacchini. *La Clin. Vet.*, 56, (7), 508-531.

MENZANI, C. — 1939 — Il Blastocystis e l'eziologia del Black-head. *Ibid.*, 62, 12-20.

NOELLER, W. — 1932 — Die wichtigsten parasitischen Protozoen des Menschen und der Tiere *in* R. V. OSTERTAG, K. WOLFFHÜGEL u. W. NOELLER — *Die Tierischen Parasiten der Haus- u. Nutztiere*, 1, 45.

PENSO, G. — 1932 — Description des kystes de Trichomonas intestinalis. *Boll, Sez. Ital. Soc. Internaz. Microb.*, 4, 165-167.

PERRONCITO, E. — 1888 — Über die Art der Verbreitung des Cercomonas intestinalis. *Centralbl. f. Bakt. I*, 4, 220-221.

PINTO, C. e FONSECA, F. DA — 1926 — Trichomonas vitali n. sp. Parasitismo das Trichomonas por Sphaerita minor CUNHA e MUNIZ, 1923 e relação das espécies de Sphaeritas conhecidas. *Bol. Biol.*, São Paulo, Fasc. 2, 34-38.

POWELL, W. N. — 1936 — Trichomonas vaginalis DONNÉ, 1936; Its Morphologic Characteristics Mitosis and Specific Identity. *Am. J. Hyg.*, 24, 145-169.

PROWAZEK, S. v. (*) — 1904 — Untersuchungen über einige parasitische Flagellaten. *Arb. Kaiserl. Gesundh.*, 21, 1-40.

PROWAZEK, S. v. — 1908 — Bemerkungen zu dem Geschlechtsproblem bei den Protozoen. *Zool. Anz.*, 32, 789-793.

SCHAUDINN, F. (*) — 1903 — Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. *Arb. Kaiserl. Gesundh.*, 19, 547.

SCHMID, A. L. und KAMNIKER, H. — 1926 — Trichomonas vaginalis. Ihre klinische Bedeutung, Morphologie und Therapie. *Arch. Gynäkol.*, 127, 362-383, Abb. 1-7.

TANABE, M. — 1926 — Morphological studies on Trichomonas. *J. Parasitol.*, Urbana, 12, 120-130.

UCKE, A. — 1908 — Trichomonaden und Megastomen in Menschendarm. *Centralbl. f. Bakt. I. (Orig.)*, 45, 231-233.

WENRICH, D. M. — 1921 — Structures and Division of Trichomonas muris (HARTMANN). *J. Morph.*, 36, 119.

WENRICH, D. H. — 1931 — Morphological Studies on the Trichomonad Flagellates of Man. *Arch. Soc. de Biol. de Montevideo. Suppl. Fasc.* 5, 1185-1204.

WENRICH, D. H. — 1939 — The morphology of Trichomonas vaginalis. *Volumen Jubilare Pro Professore Sadao Yoshida, vol. II. The Osaka Natural History Society. The Institute for Research in Microbic Diseases, Osaka Imperial University, Japan,* 65-80.

WENYON, C. M. — 1907 — Observations on the Protozoa in the intestine of mice. *Arch. f. Protistenk., Suppl.* 1, 169-201.

WENYON, C. M. — 1910 — A new flagellate (Macrostoma mesnili n. sp.) from the human intestine with some remarks on the supposed cysts of Trichomonas. *Parasitol.*, 3, 210-215.

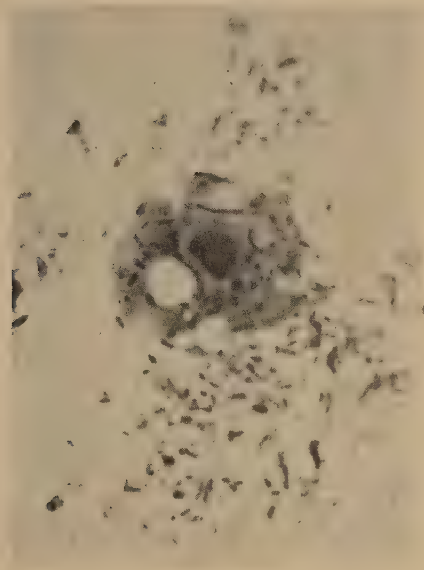
WENYON, C. M. — 1915 — Observations on the common intestinal Protozoa of man; their diagnosis and pathogenicity. *The Lancet.* London, 2, 1173-1183.

WENYON, C. M. — 1926 — Protozoology. London, 650.

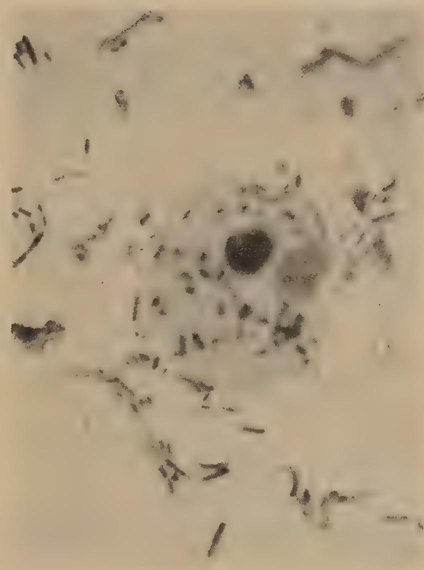
WENYON, C. M. e O'CONNOR, F. W. — 1917 — Human intestinal Protozoa in the Near East. London.

(*) Não consultado o original.

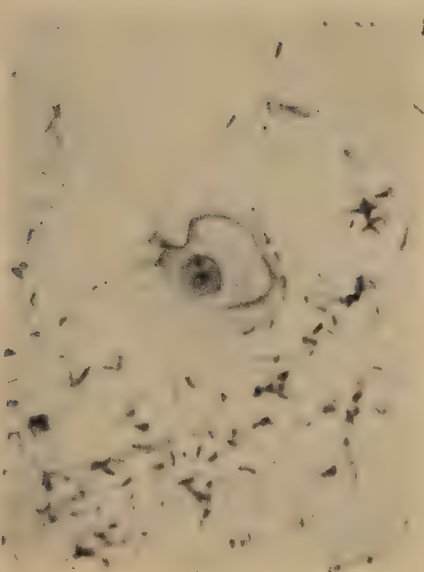
———o———



A



B

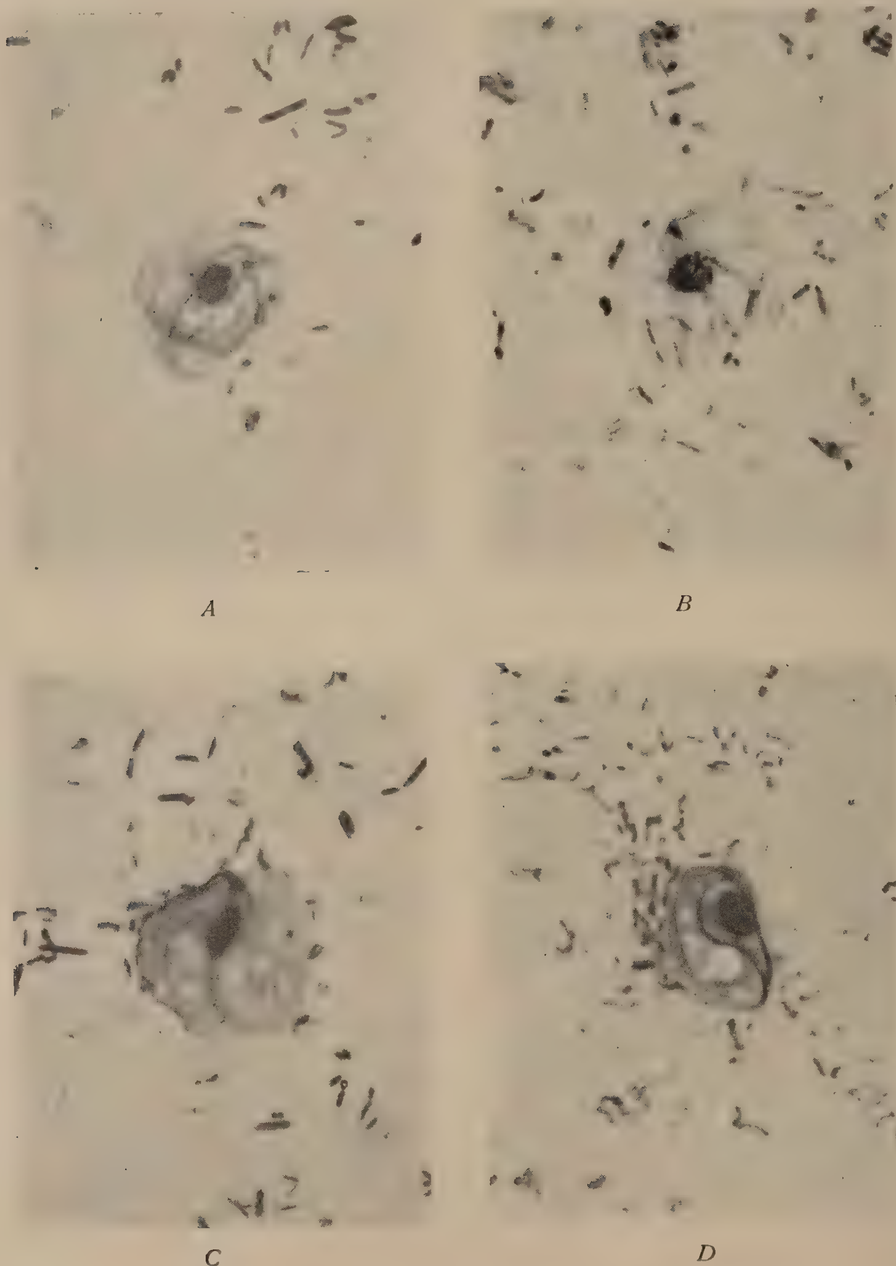


C

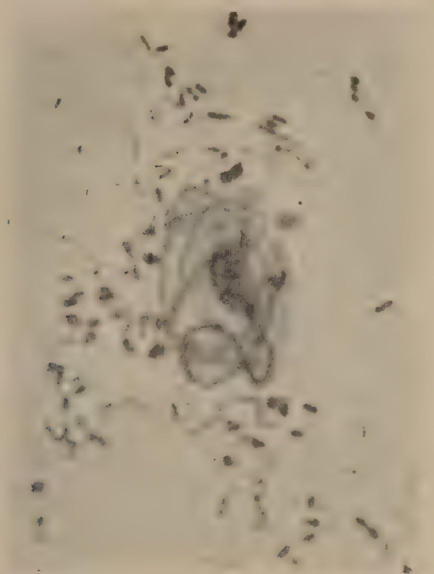


D

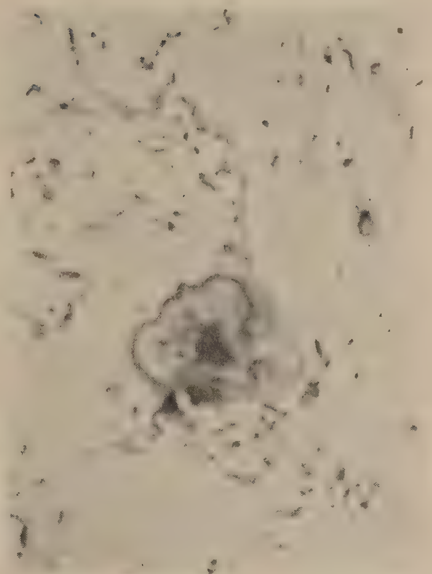
Fig. *A* — *T. vitali:* forma aflagelada imóvel — Figs. *B*, *C* e *D* — *T. vitali:* formas ameboides com flagelos inclusos. (FEDERMAN fot.)




Figs. *A* e *B* — *T. vitali:* formas ameboides com flagelos inclusos. — Figs. *C* e *D* — *T. vitali:* formas ameboides sem flagelos livres, com membrana ondulante e axostilo. (FEDERMAN fot.)



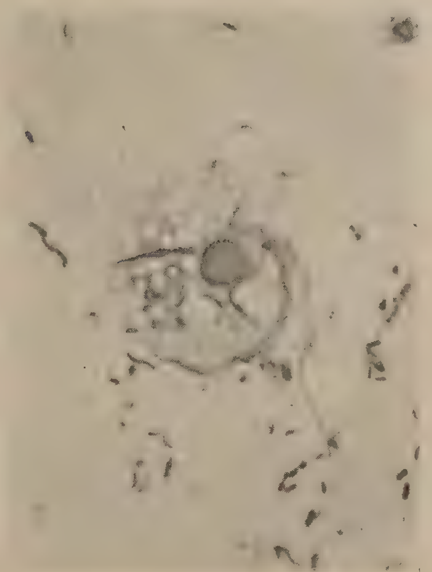
*A*



*B*

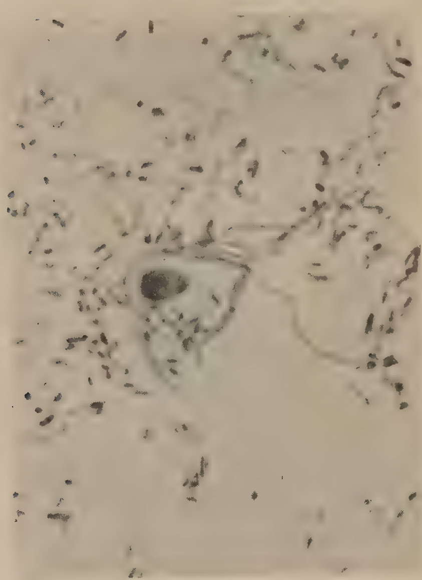


*C*

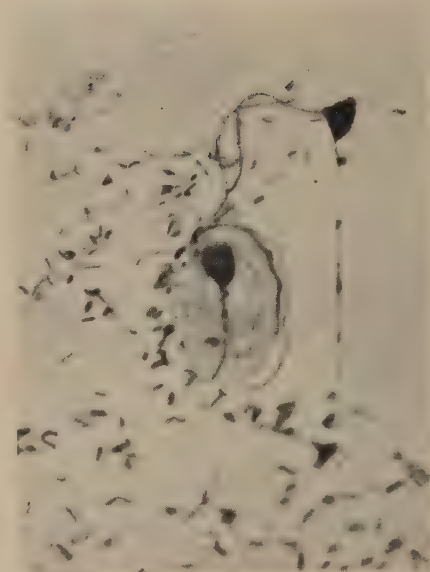


*D*

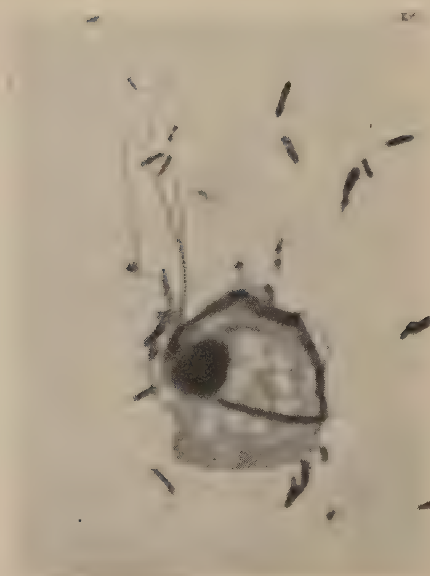
Fig. *A* — *T. vitali:* forma ameboide sem flagelos livres, com membrana ondulante e axostilo. — Fig. *B* — *T. vitali:* forma com flagelos livres e membrana ondulante. — Figs. *C* e *D* — *T. vitali:* formas senescentes. (FEDERMAN fot.)



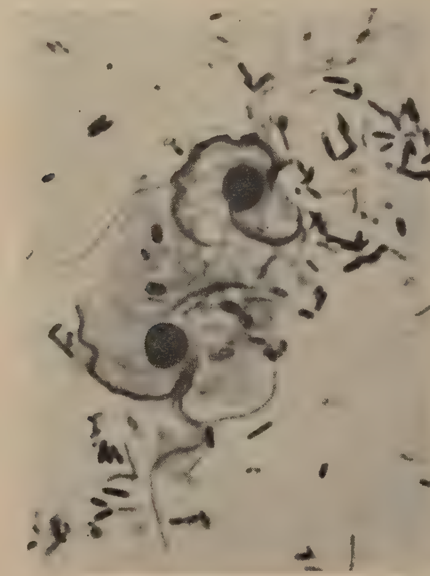
*A*



*B*



*C*



*D*

Figs. *A* e *B* — *T. vitali:* formas com flagelos livres, axostilo e flagelo recurrente liberado. — Fig. *C* — *T. vitali:* forma tricomonada típica. — Fig. *D* — *T. vitali:* formas tricomonadas típicas. (FEDERMAN fot.)



Trecho de uma película cinematográfica, apresentando uma forma ameboide de *Trichomonas vitali.* Filmagem feita em campo escuro. Podemos observar os vários movimentos apresentados pelo protozoário. (FEDERMAN microcinematogr.)



Trecho semelhante ao anterior, porém muito ampliado. (FEDERMAN microcinematogr.)

Vol. 11 — Art. 42 1940

# CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA MORFOLOGIA, BIONOMIA E ECOLOGIA DE "TEMNOCEPHALA BREVICORNIS MONTICELLI, 1889"

POR

C. Pereira e R. Cuocolo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 8 figuras no texto e estampas 57-61

## INTRODUÇÃO

O estudo dêste curioso tipo de platelminto foi iniciado na América do Sul, com a descrição de *Temnocephala chilensis* (MOQUIN-TANDON, 1846), sôbre crustáceos macruros e anomuros chilenos de água doce.

Justamente a segunda espécie do gênero foi descrita tambem de material sul-americano, desta vez em quelônio brasileiro de água doce, sob a denominação de *T. brevicornis* MONTICELLI, 1889.

Outras espécies e alguns gêneros foram sendo acrescentados a êste grupo, sempre em crustáceos decápodos de água doce, excepto outra espécie, tambem brasileira, assinalada sôbre um gasterópodo de água doce.

Conseguiram-se apreciaveis progressos no que diz respeito ao conhecimento da anatomia da espécie-tipo e de mais algumas espécies do Pacífico. Quanto às seis espécies assinaladas no Brasil, devido à insuficiência das descrições originais de MONTICELLI (1889-1913) e de HASWELL (1893), permaneceram em situação particularmente confusa, o que exige um cuidadoso trabalho de revisão, em vias de execução atualmente por nós.

MERTON (1922) tornou mais conhecida a anatomia de *T. brevicornis* em material proveniente de Terezópolis, em outubro de 1913, o qual supoz devesse constituir uma sub-espécie particular, que denominou *T. brevicornis intermedia* MERTON, 1922; BAER (1931) invalidou esta sub-espécie, com o que estamos de pleno acôrdo, pois não são em absoluto convincentes as diferenças assinaladas, tais como: situação relativa do acetábulo, que nada tinha de particular em seu material; ausência de pigmento no corpo, o que verificamos ser normal nesta espécie; ausência de pigmento nos olhos, impressão que se

tem sempre que se trabalha exclusivamente com material fixado; ligação intertesticular em cada lado do corpo, o que verificamos normalmente em nosso abundante material.

Tendo nós oportunidade de obter material vivo de *T. brevicornis*, julgamos oportuno fazer um estudo anatômico e histológico desta espécie, o que foi feito não só em toto-montagens como em cortes seriados, muito bem feitos pelo auxiliar-técnico Snr. J. FERRAZ, tendo sido possivel tambem colher informações, que reputamos assás interessantes, sôbre a bionomia e ecologia dêste curiosíssimo platelminto, no que fomos grandemente auxiliados pelo servente Snr. C. W. MEYER.

Deixando de lado o problema da sistemática dêste aberrante grupo para ser tratado em futuro trabalho, lembramos que as opiniões dos diversos pesquizadores, no que diz respeito ao tipo de relações existentes entre os temnocéfalos e seus hospedeiros, oscilaram sempre entre parasitismo e comensalismo, ao passo que pensamos ter demonstrado tratar-se, nesta espécie, na realidade, de inquilinismo, componente de uma interessante comunidade bio-ecológica: *Temnocephala — Chelidae — Naididae.*

O estudo morfológico foi feito principalmente sôbre material colhido de *Hydromedusa tectifera* COPE, proveniente de Varginha, municipio de S. Paulo, Estado de São Paulo, Brasil, em novembro de 1938.

O estudo bionômico foi feito em material de igual hospedeiro e proveniência, obtido em janeiro de 1940.

Foi tambem estudado material colhido sôbre *Hydromedusa maximiliani* proveniente de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em janeiro de 1935, gentilmente cedido pelos profs. L. TRAVASSOS e H. LENT, bem como um espécimen do mesmo hospedeiro, proveniente de Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil, colhido em agosto de 1938, devido à amabilidade do Prof. J. CANDIDO CARVALHO, aos quais muito agradecemos.

## *Temnocephala brevicornis* MONTICELLI, 1889

Sin.: *T. brevicornis intermedia* MERTON, 1922.

### MORFOLOGIA

**Morfologia externa:** corpo achatado dorso-ventralmente, de contôrno elíptico, apresentando anteriormente cinco apêndices digitiformes e posteriormente um órgão de fixação. Sôbre o hospedeiro, o corpo se apresenta com forte convexidade dorsal e ligeira concavidade ventral, assemelhando-se a uma calota esférica. Dimensões relativamente grandes e um tanto variáveis:

TABELA: 1

Dimensões em milímetros (comprimidos)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento (do bordo posterior da ventosa à ponta do apêndice mediano) | 5,50 | 3,60 | 3,93 | 3,55 | 4,20 | 3,55 | 3,98 | 2,62 | 2,82 | 3,22 |
| Maior Largura . . . . . | 2,62 | 2,62 | 2,56 | 2,35 | 1,80 | 2,18 | 2,13 | 1,80 | 1,70 | 1,91 |

As diferenças de dimensões explicam-se em parte pela extrema elasticidade do animal. Os apêndices digitiformes são dotados de grande contractilidade, donde a dificuldade de se precisarem as dimensões. São de fórma cônica e relacionados na base, podendo contudo esticar enormemente, chegando a ficar quasi filiformes; são sensivelmente iguais, havendo contudo um ligeiro decréscimo na altura a partir do mediano para os laterais; estão simetricamente colocados, de maneira a se considerar um mediano, dois paramedianos (direito e esquerdo) e dois laterais (direito e esquerdo). Os apêndices podem ser utilizados quer no deslocamento do animal quer na captura de seus alimentos. Em dez de nossos exemplares o comprimento do apêndice mediano oscilou entre 0,33 e 0,66 mm. O órgão fixador ou acetábulo, fortemente musculoso, subterminal, situado ventralmente, é utilizado no deslocamento do animal, bem como na sua fixação sôbre a superfície do corpo do hospedeiro; de contôrno circular, em forma de taça muito larga e muito raza; apresenta estrias circulares concentricas escassas e muito evidentes, e estrias radiadas mais numerosas e menos acentuadas; as estrias concêntricas são intrínsecas do órgão, emquanto as radiadas são de fibras musculares comuns ao pedúnculo e com ponto de inserção em outras regiões do epitélio de revestimento; o pedúnculo é tambem muito musculoso, de diâmetro avantajado, principalmente no ponto de implantação, sôbre a face ventral do animal, relativamente curto, em forma de tronco de cone, de cêrca de 0,25 mm. de altura, tendo a base inserida na porção mediana, subterminal da face ventral, e o ápice, truncado, no centro da ventosa.

TABELA: 2

Diâmetros do acetábulo em milímetros

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Diâmetro externo . . . . . . | 1,20 | 0,97 | 1,03 | 0,91 | 0,91 | 1,01 | 0,83 | 0,80 | 0,93 | 0,89 |
| Diâmetro interno . . . . . . | 0,63 | 0,45 | 0,57 | 0,51 | 0,51 | 0,53 | 0,41 | 0,38 | 0,45 | 0,43 |

Tegumento: revestindo o corpo todo, existe um epitélio sincicial, tendo os núcleos dispersos pela massa citoplasmática, de maneira irregular. A espessura é mais ou menos uniforme em toda a extensão, tendo cêrca de 8 micra de altura. O citoplasma apresenta uma estriação abundante em sentido perpendicular à superfície corpórea; esta estriação faz com que o epitélio, visto de face, assuma o aspeto de uma vasta rede anastomótica. As estrias são dotadas de uma basofilia muito mais intensa que o restante do citoplasma, o que as torna facilmente evidenciáveis. Os núcleos do epitélio são relativamente volumosos,

elipsoides, com o maior eixo perpendicular à superfície do corpo. Os núcleos têm em média 6 micra de maior eixo e 4 micra de largura. O epitélio repousa sôbre uma membrana basal mais ou menos espêssa e uniforme, ligeiramente eosinófila. Externamente o epitélio apresenta uma cutícula delgada com tendência à eosinofilia; essa cutícula torna-se mais evidente ao nível dos poros excretores, do poro genital externo e da abertura bucal.

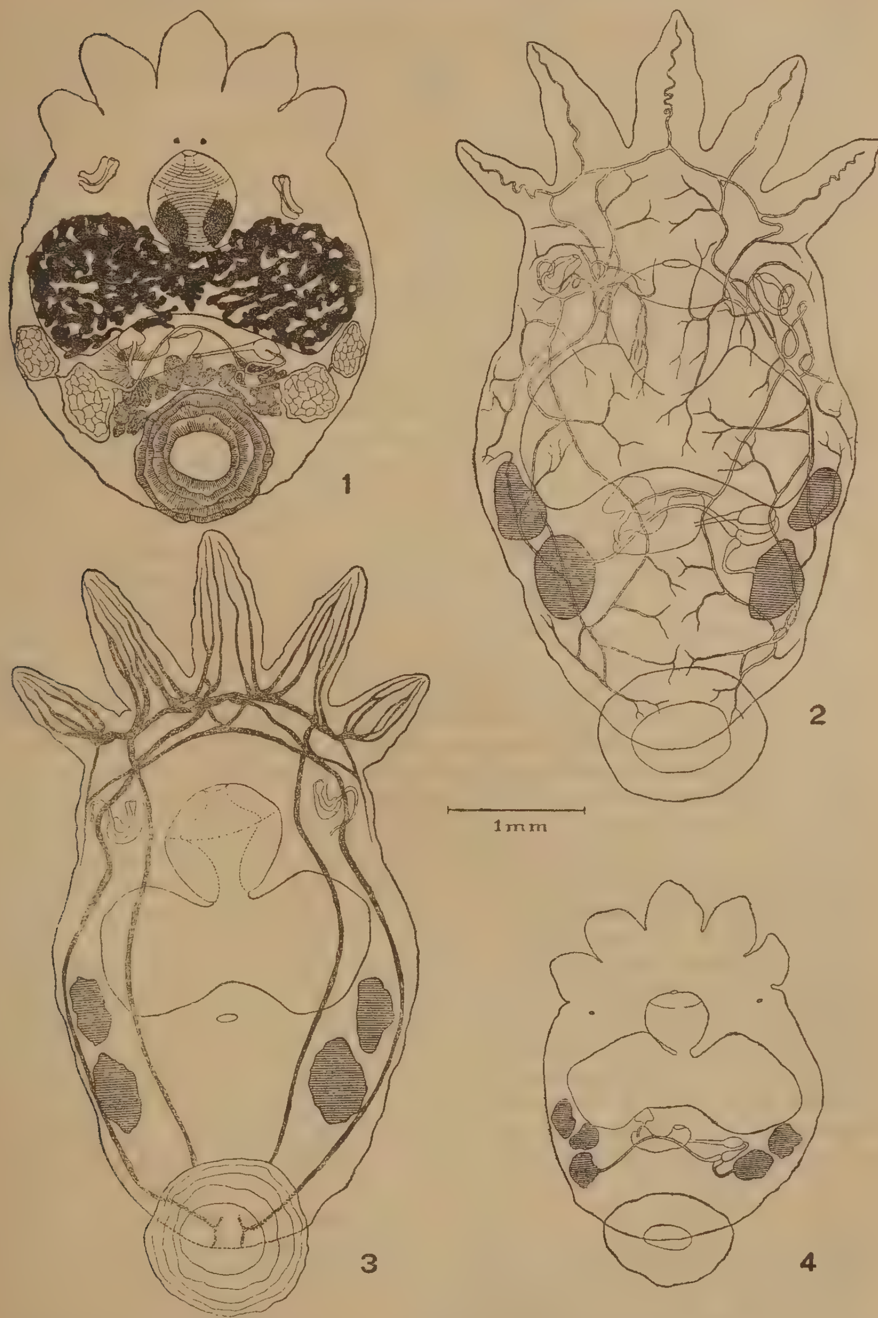
Sistema muscular: O sistema muscular é assás desenvolvido, constando principalmente de uma forte musculatura subepidérmica, constituida por várias camadas de fibras musculares em diferentes disposições e de grupamentos de fibras musculares, à maneira de músculos rudimentares, indo principalmente da parede dorsal, em sentido perpendicular, à parede ventral do corpo, cindindo o parênquima e tomando inserção nas duas extremidades sôbre o epitélio de revestimento do corpo; outras fibras, reunidas em feixes, com direção ligeiramente inclinada, vão da parede dorsal do corpo a diferentes órgãos contidos no parênquima. Da musculatura sub-epidérmica, a ventral é muito mais desenvolvida que a dorsal, particularmente na região mediana, no intervalo compreendido entre o órgão fixador e a porção posterior do faringe, onde as fibras musculares invadem em grande extensão o parênquima correspondente; explica isso a tendência que o animal apresenta a aproximar ventralmente as duas extremidades do corpo. As fibras musculares são, de um modo geral, muito longas e de espessura de pouco mais de um micron, sendo as longitudinais mais calibrosas que as anelares. Salvo as fibras constituintes dos feixes musculares destinados aos órgãos contidos no parênquima, que possuem um ponto de inserção sôbre êles, todas as outras apresentam, tanto a inserção de origem como a terminal no epitélio de revestimento. As fibras têm secção circular ou ligeiramente eliptica, apresentando um decréscimo de diâmetro próximo às extremidades. São sempre simples, nunca ramificadas ou anastomosadas. Não apresentam extrutura fibrilar, tendo uma zona periférica mais intensamente eosinófila e uma central menos corável. Frequentemente as fibras mostram-se nos preparados, como ôcas, isso devido à retração da substância medular flúida, no decorrer da fixação. As fibras não apresentam vestígios nucleares e coram-se forte e uniformemente pela eosina. A disposição geral da musculatura sub-epidérmica sofre certas variações, conforme a região que se considera, particularmente quando se compara a musculatura dorsal com a ventral. Na parede dorsal, logo abaixo da membrana basal do epitélio, encontramos uma camada, não muito desenvolvida, de fibras musculares anelares que voltando-se ventralmente à esquerda e à direita, vão entrar na constituição da camada correspondente ventral. Ao nível da raiz dos tentáculos estas fibras apresentam um comportamento interessante, passando algumas sem interrupção, emquanto outras mudam de direção e passam a fazer parte da musculatura longitudinal dêsses órgãos. Abaixo da camada de fibras anelares existe outra, delgada, de fibras longitudinais, e, abaixo desta, mais algumas fibras transversais. Ventralmente a musculatura sub-epidérmica complica-se muito mais. Logo abaixo da membrana basal do epitélio existe uma camada delgada de fibras anelares, na qual podemos distinguir dois folhetos, um externo e outro interno, entre os quais acham-se interpostas algumas fibras musculares ântero-posteriores, dispostas em uma só fileira e assás distantes uma das outras. Imediatamente depois, vem uma camada bastante espêssa de fibras longitudinais e diagonais, sendo a disposição e o número de fibras constituintes desta camada, muito variável, de região a região. Da base dos tentáculos até a altura da

abertura bucal encontramos um lote de fibras musculares longitudinais, algumas das quais terminam nesse nível, emquanto outras, em particular as mais lateralmente situadas, dirigem-se para trás e para fora. Outro lote de fibras longitudinais parte do limite posterior do faringe e vai até o ponto de implantação do pedúnculo da ventosa, onde muda de direção, passando a fazer parte da musculatura longitudinal dêle. Ha ainda fibras longitudinais, mais longas que as precedentes e que vão, lateralmente, desde a base dos tentáculos ao pedúnculo da ventosa e à extremidade posterior do corpo. As demais fibras têm um percurso arciforme. Ha fibras arciformes longas, que da base dos tentáculos vão até a porção posterior do corpo, e outras mais curtas, em situação mais diagonal, que partindo do pedúnculo da ventosa e regiões circunvisinhas, vão às paredes laterais do corpo. Na porção anterior da face ventral, no espaço compreendido entre o faringe e a base dos tentáculos, internamente às fibras longitudinais, encontram-se mais duas camadas de fibras transversais, bem desenvolvidas, entremeadas por uma delgada porção de parênquima. Na região posterior, no espaço compreendido entre o poro genital externo e o pé do pedúnculo, a musculatura assume um aspeto ainda mais complicado. Afora as fibras longitudinais e diagonais, de que já falamos, ha mais duas categorias de fibras, que abraçam simultaneamente o pedúnculo da ventosa e o poro genital externo. Uma primeira série de fibras tem o aspeto de *S* itálico que com uma das extremidades se insere sôbre o pedúnculo, abraçando-o com a sua concavidade posterior, e com a outra extremidade se vai inserir no epitélio do poro genital, abraçando-o pelo lado opôsto, com a sua concavidade anterior. Assim as fibras de um lado assumem com as do lado opôsto, no conjunto, o aspeto de um oito. A outra série é constituida por fibras com a figura de um *C*, muito alto, que inserindo-se sôbre o epitélio do pedúnculo e do poro genital, abraçam pela concavidade, simultaneamente, o pedúnculo e o poro genital. O conjunto destas fibras de um lado com as do lado oposto toma o aspeto de uma oval, com o polo obtuso voltado posteriormente. Nos tentáculos predomina a musculatura longitudinal, que fica abaixo de uma camada muito delgada de fibras anelares. A musculatura do acetábulo é muito desenvolvida. As fibras musculares no pedúnculo têm uma disposição longitudinal em relação a êle e, ao passar para a ventosa propriamente dita, tomam uma disposição radiada. No pedúnculo podemos distinguir tres camadas de fibras musculares longitudinais, colocadas concentricamente e cada uma formada por duas séries de fibras, de inclinação oposta, umas em relação às outras. Na ventosa propriamente dita predominam as fibras radiadas que no pedúnculo tinham uma disposição longitudinal; ha tambem uma musculatura circular intrínseca, constituida por vários aneis concêntricos e a distância regular uns dos outros. As fibras musculares dorso-ventrais são tambem muito numerosas, tomam inserção em dois pontos, um dorsal e outro ventral, do epitélio de revestimento, encontram-se grupadas aos feixes, constituindo assim verdadeiros músculos dorso-ventrais, que cindem o parênquima em direção perpendicular. Afora êsse feixes, existem outros grupamentos de fibras, que vão do epitélio dorsal à parede dos diferentes órgãos contidos no parênquima.

Sistema nervoso: consta de um grande gânglio central (= cérebro) de onde parte uma série de nervos periféricos. O gânglio cerebróide tem uma situação dorsal, adiante do faringe, na linha mediana, logo para trás da base dos tentáculos. E' de forma aproximadamente elipsoidal, com o maior eixo disposto transversalmente e medindo cêrca de 400 micra. E' relativamente alto,

apresentando um eixo vertical de cêrca de 200 micra. E' constituido por substância finamente granulosa e por células gangliares bipolares. A substância granulosa tem fraca afinidade cromática e apresenta-se prevalentemente na medula e no dorso do gânglio cerebróide, emquanto as células bipolares dispõem-se principalmente na periferia e na face ventral do gânglio. As células bipolares do gânglio são pequenas, alongadas, com 16-20 micra de comprimento e 8-10 micra de largura mais ou menos, apresentando um núcleo central muito pequeno, basófilo e esferóide. A disposição das células bipolares é radial, em relação ao núcleo de substância granulosa. Do gânglio cerebróide partem os nervos, que podem ser divididos em anteriores e posteriores. Os nervos anteriores são destinados particularmente aos tentáculos, emquanto os posteriores destinam-se a todo o resto do corpo, que fica para trás do gânglio cerebróide. Os nervos anteriores são em número de 4 a 6 por tentáculo. Do gânglio cerebróide parte, para cada lado, um grosso ramo nervoso que, no conjunto, assumem o aspeto de um grande arco cuja concavidade se encontra voltada posteriormente. Na convexidade dêsse arco nervoso existem quatro pontos de emergência dos nervos anteriores ou tentaculares, dois laterais e dois mediais. Dos pontos laterais têm origem os nervos dos tentáculos laterais e os nervos laterais dos tentáculos paramedianos. Do ponto medial direito nascem os nervos mediais do tentáculo paramediano direito e os nervos do lado direito do tentáculo mediano. No ponto medial esquerdo estão incluidos os nervos mediais do tentáculo paramediano esquerdo e os nervos do lado esquerdo do tentáculo mediano. Frequentemente os nervos não têm origem direta do arco nervoso e sim de alças emitidas por êle. No interior dos tentáculos os nervos dividem-se e subdividem-se abundantemente, trocando entre si numerosas anastomoses. Muitas vezes notam-se tambem ramos que, partindo de um nervo, vão juntar-se ao mesmo em um ponto mais distal. Para a extremidade posterior partem seis nervos longitudinais importantes, dois dorsais, dois ventrais e dois laterais. Dêsses nervos partem muitos ramos transversos destinados à inervação da parte restante do corpo que está compreendida entre o gânglio cerebróide, anteriormente, e o órgão de fixação, posteriormente.

Olhos: são dois, duplos, situados anteriormente, adeante do faringe, simetricamente de cada lado da linha mediana. São grandes, medindo cêrca de 110 micra de comprimento e cêrca de 38 micra de largura. Têm uma situação dorsal, com o maior eixo dirigido para trás e medialmente. São de forma alongada, com as extremidades obtusas, donde partem os ramos nervosos, contôrno cilíndrico, um tanto estrangulado na porção mediana, correspondente à célula de pigmento. Cada olho consta de duas células nervosas visuais, situadas nas extremidades do olho. São de perfil semilunar, tendo 35-38 micra de comprimento e cêrca de 16 micra de maior largura; possuem, em posição central, um núcleo esferoidal, pequeno, com cêrca de 4 micra de diâmetro, dotado de um nucléolo central, esférico, fortemente basófilo. Para dentro, existem mais dois elementos apresentando diâmetro transverso com 50-56 micra de comprimento, com forma de lente biconvexa, com a face lateral de menor raio que a medial e cuja face mais convexa se adapta à concavidade da célula visual e a outra à concavidade da célula pigmentar. No seu interior apresentam uma série de bastonetes basófilos, e na base possuem uma formação fusiforme, eosinófila, que se põe em relação com a da célula do outro lado por meio de uma comissura cilíndrica, a qual atravessa a célula pigmentar. Finalmente, em posição mediana, existe uma célula pigmentar, que no vivo é de coloração vermelha intensa. E' em forma de lente bicôncava, medindo 20-25 micra de altura e 16-18 micra de largura. Apresenta




*Temnocephala brevicornis:* Fig. 1 - Total, em toto-montagem. Fig. 2 - Aparelho excretor, a fresco. Fig. 3 - Troncos nervosos, em toto-montagem. Fig. 4 - Testículo extranumerário direito. (RUTH DEL.)

uma fina granulação, correspondente ao pigmento que empresta aos olhos a sua coloração característica. Tal pigmento, que no vivo sofre uma expansão quando sujeito a uma iluminação intensa, retraindo-se quando a intensidade diminue, desaparece completamente quando o animal é fixado.

Aparelho excretor: — o aparelho excretor é particularmente visível no vivo. Consta de duas vesículas excretoras e de uma vasta rede de canais ramificados e anastomosados por inosculação. Tanto os canais como as vesículas apresentam-se extremamente deformáveis e, em particular, os canais acompanham todas as variações do corpo. Existem dois poros excretores, situados dorsalmente, na metade anterior do corpo, mais ou menos na união do têrço anterior com os dois têrços posteriores, simetricamente colocados, à direita e à esquerda do faringe. Encontram-se sensivelmente em um mesmo plano transversal, que ventralmente passa pelo orifício bucal. São de contôrno circular ou ligeiramente elíptico, de maior eixo disposto transversalmente. Ao nível dos poros excretores, o epitélio sincicial de revestimento inflete-se, atapetando as paredes do curto canal cilíndrico que separa a vesícula excretora da abertura externa do aparelho excretor e, neste ponto, a cutícula epitelial encontra-se ligeiramente mais espessada. Ventralmente aos poros excretores estão as vesículas excretoras. Estas são em número de duas, uma para cada lado, simetricamente colocadas em relação à linha mediana, muito próximas das paredes laterais do corpo. As dimensões e a forma das vesículas são extremamente variáveis, devido à grande elasticidade de suas paredes e aos constantes movimentos de contração e de dilatação a que estão sujeitas. São grandes, mais longas do que largas, de forma em geral tubular, ou ligeiramente rômbicas em sua porção mediana e dotadas de paredes consideravelmente espêssas. As vesículas apresentam um joelho, mais ou menos em sua porção mediana, o que permite considerar dois ramos, um descendente, posterior e outro ascendente, que termina no poro excretor externo. Os dois ramos encontram-se acolados, de modo que, nos cortes frontais, as vesículas apresentam-se com a figura de um oito. Suas paredes são constituidas por um grande sincício, relativamente pobre em núcleos. Êsse simplasto apresenta citoplasma constituido por fino retículo e é dotado de núcleos volumosos que, em posição ligeiramente excêntrica, apresentam um nucléolo esferóide intensamente basófilo. A luz da vesícula, em geral, é tambem de forma tubular, contudo muito variável no vivo, pois encontra-se em constantes movimentos de dilatação e contração; geralmente é assás restrita, comparada com o diâmetro externo da vesícula. A luz das vesículas apresenta-se em toda a extensão revestida por curtos cílios vibráteis. Imersas no parênquima, as vesículas apresentam externamente um revestimento devido à condensação do conjuntivo ambiente, entremeado de algumas fibras musculares, e é a estas, em particular, que as vesículas devem a sua extrema contractilidade. Os canais excretores são intracelulares, de paredes sinciciais muito delgadas e, em geral, de calibre muito pequeno. Uma esquematização perfeita do sistema de canais é praticamente impossível da fazer-se, pois êle sofre variações de indivíduo para indivíduo, além do que, varia no mesmo indivíduo, conforme o estado fisiológico. Esquematizando, de um modo geral, podemos considerar em primeiro lugar os coletores principais, em número de quatro, dois para cada lado, sendo um anterior e outro posterior. Os canais anterior e posterior de cada lado unem-se antes de chegar à vesícula correspondente. A união dos canais se dá em plano transversal situado sempre posteriormente ao que passa pelas vesículas. Do ponto de união parte um canal único, em geral curto, às vezes mais longo, descrevendo várias contorsões antes de desembocar na vesícula. Os dois canais anteriores

unem-se por inosculação, na linha mediana, próximo à base do tentáculo mediano, formando assim um grande arco anterior, cuja concavidade se encontra voltada para a extremidade caudal. A' convexidade dêsse arco chegam cinco coletores grandes, correspondentes aos cinco tentáculos. Os canais tentaculares apresentam-se, em geral, com um grande número de sinuosidades, variáveis conforme o estado de distensão dos tentáculos. Da concavidade do arco partem dois canais importantes, situados simetricamente de cada lado da linha mediana, e cujo calibre é equivalente ao dos canais principais; êstes canais tem um percurso em *S*, de calibre mais ou menos uniforme em toda a sua extensão e, na altura do intestino, inosculam-se com ramos correspondentes vindos da extremidade caudal. Os ramos do arco anterior, conjuntamente com ramos provindos da extremidade posterior, formam de cada lado do faringe uma grande rede anastomótica. Os ductos posteriores resultam de um grande número de canais correspondentes aos dois terços posteriores do corpo. Aos canais principais chega um grande número de canais secundários de calibre médio, resultantes, por sua vez, de uma grande rede dicotômica de canais de pequeno calibre.

Aparelho digestivo: Tubo incompleto, terminando em fundo de saco. Abertura bucal, colocada ventralmente na linha mediana, para trás do gânglio cerebroide, equidistante e no mesmo plano transversal do das vesículas excretoras, subterminal, mais ou menos na união do quarto anterior com os três quartos posteriores. Forma um tanto variável, geralmente em fenda elíptica, de maior eixo transverso, podendo, às vezes, conforme o estado de contração reduzir-se a um simples orifício circular. Podemos considerar dois lábios, um anterior, pouco côncavo, de concavidade voltada posteriormente, outro posterior de concavidade bem acentuada, voltada para a extremidade anterior. As dimensões são extremamente variáveis devido à sua extrema contratilidade. Para o eixo transverso da abertura bucal encontrámos valores oscilando entre 0,080 e 0,436 mm. Cavidade bucal, pouco ampla, apresentando-se sob a forma de um tubo aproximadamente cilíndrico, de direção ventro-dorsal, às vezes um pouco mais dilatado na sua porção mediana; por meio de um orifício mais ou menos circular comunica-se com um faringe volumoso. A cavidade bucal é internamente revestida por um epitélio idêntico ao que reveste a superfície corpórea do animal, mas aqui não encontramos núcleos, o epitélio é relativamente espêsso, tendo a parte que olha para a luz diferenciada em cutícula. Faringe, órgão volumoso, essencialmente muscular. Forma mais ou menos globosa, havendo porém, em geral, uma ligeira predominância do eixo sagital sôbre o transverso, além do que o diâmetro máximo transverso encontra-se mais próximo do orifício bucal que do orifício esofagiano do faringe. Quanto à direção, podem ser consideradas duas porções, uma praticamente vertical e outra inclinada de trás para deante e de cima para baixo; a inclinação desta segunda porção vai aumentando de tal modo que, próximo ao esôfago, o faringe tem uma direção praticamente horizontal. As dimensões tambem variam dentro de certos limites, como se verifica pela tabela 3.

TABELA: 3
Faringe e Boca

| | | 1 | 2 | 4 | 6 | 7 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Faringe | Comprimento . . . . . . | 0,87 | 0,65 | 0,71 | 0,61 | 0,67 | 0,53 |
| | Larg. máxima . . . . . . | 0,82 | 0,65 | 0,71 | 0,59 | 0,61 | 0,51 |
| Diâmetro transv. da abertura bucal | | 0,44 | 0,33 | 0,30 | 0,10 | 0,18 | 0,08 |

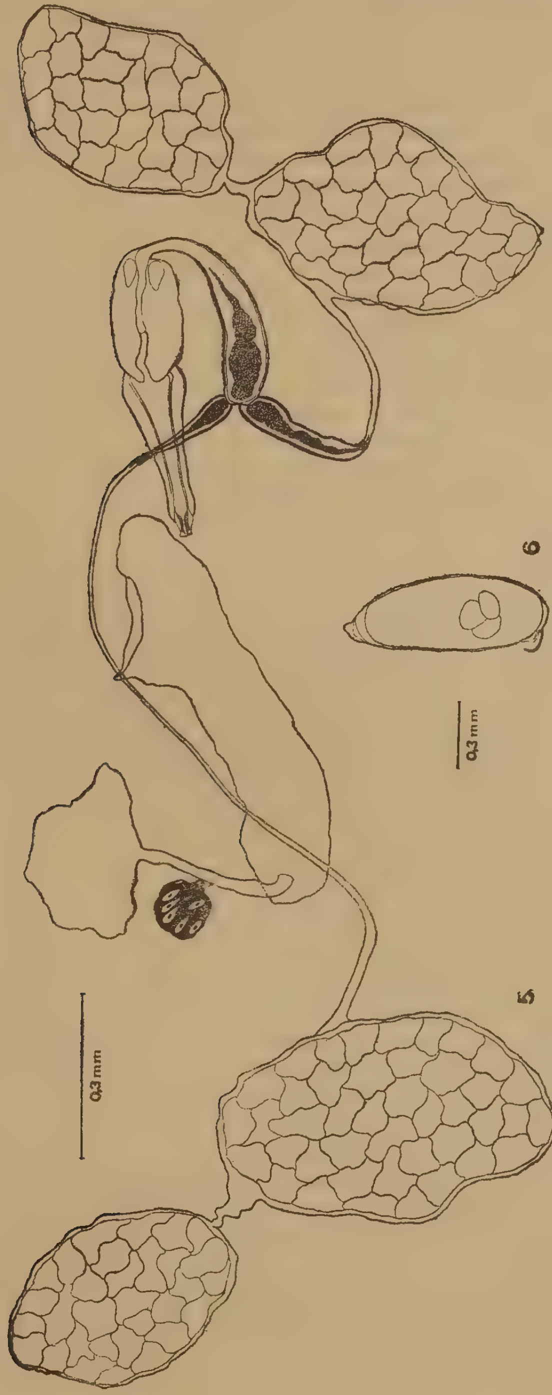
Logo abaixo do orifício bucal do faringe, devido a uma ligeira inclinação da primeira porção do faringe em relação à cavidade bucal, surgem dois recessos, denominados bolsas faringeanas, uma anterior, mais profunda, e outra inferior, mais raza, ambas em comunicação lateralmente. Na passagem da primeira para a segunda porção do faringe tambem encontramos dois recessos, contudo menos acentuados que os precedentes. A cavidade faringeana apresenta o seu maior eixo transverso na união do têrço anterior com os dois têrços posteriores do órgão. A cavidade faringeana pode, como o próprio órgão, ser dividida em duas porções, uma anterior, que se segue à cavidade bucal e que corresponde à porção vertical do órgão, apresentando-se sob a forma de calota esférica, a segunda porção relacionando-se com o intestino, por meio de um esôfago muito curto; é infundibuliforme, seu diâmetro transverso vai decrescendo gradativamente até próximo da abertura posterior do faringe, onde se alarga um pouco. A primeira porção corresponde ao esfincter anterior e à zona das células glandulares faringeanas, emquanto a segunda porção corresponde ao esfincter posterior do faringe; aliás a forma da cavidade faringeana é condicionada particularmente pelos dois esfíncteres.

Internamente o faringe é revestido por um epitélio da mesma natureza do que reveste a superfície corpórea; aqui, porém, como na cavidade bucal, não se verifica a presença de núcleos. O epitélio é consideravelmente espêsso, tendo a parte mais externa diferenciada em cutícula. Externamente o faringe é envolvido por uma ganga de tecido conjuntivo, que lhe constitue um verdadeiro saco envolvente. A musculatura do faringe é particularmente complicada. Além dos esfíncteres podemos considerar fibras anelares, longitudinais e radiais. Externamente encontramos uma camada de fibras anelares, em forma de fitas espêssas, que se sucedem deixando pequenos intervalos entre si, constituindo a musculatura circular externa, logo abaixo do envólucro conjuntivo. Abaixo desta camada encontramos outra, pouco espêssa, de fibras musculares longitudinais, constituindo a musculatura longitudinal externa. Internamente, logo abaixo do epitélio faringeano, encontramos nova camada de fibras anelares: musculatura circular interna. Abaixo da musculatura circular interna e da zona das glândulas faringeanas e mioblastos encontramos nova camada muscular, constituida por fibras longitudinais, arciformes, indo de um ao outro esfincter: musculatura longitudinal interna. A musculatura radial não tem uma sistematização perfeita: suas fibras dispõem-se esparsamente, em particular no segmento compreendido entre os dois esfíncteres faringeanos, tomando inserção, de um lado no saco conjuntivo faringeano e, do outro, no epitélio que reveste a luz do faringe. Ao nível dos dois polos do faringe a musculatura é condensada em esfíncteres. Um esfincter anterior ou bucal, pequeno, guarnece a parte anterior da primeira porção do faringe; o esfincter posterior corresponde à toda segunda porção do faringe. Ambos os esfíncteres são formados essencialmente por fibras circulares, anelares, muito densas, de permeio às quais encontramos algumas fibras radiais. Êstes dois esfíncteres permitem ao faringe o desempenho do papel de bomba aspirante. Entre um esfincter para frente e o outro para trás, compreendidos entre as camadas musculares interna e externa, encontramos um grande número de mioblastos. Êstes mioblastos estão dispostos à maneira de uma corôa, particularmente na zona em que o faringe atinge o seu maior diâmetro transverso. Esta corôa é constituida por algumas dezenas dessas unidades: são células volumosas, de contôrno estrelado, emitindo prolongamentos em todas as direções,

dotadas de um citoplasma compacto, carregado de granulações, possuindo um núcleo esferoidal mais ou menos no centro do corpo celular. Glândulas faringeanas: entre as musculaturas longitudinais interna e externa, indo de um a outro esfincter, existe um anel constituido por células glandulares, células glandulares faringeanas. São células grandes, com limites pouco nítidos, citoplasma francamente vesiculoso, ligeiramente basófilo, com núcleo mais ou menos volumoso, tendo em geral situação basal e provido de pouca cromatina. Por meio de canalículos extremamente delicados, que atravessam a musculatura interna, essas glândulas vertem o seu produto de secreção na lúz do faringe. Entre êstes elementos glandulares, afora os mioblastos, encontramos células volumosas, com grande núcleo dotado de nucléolo, e que têm um caracter nervoso. Na parte posterior do faringe, desembocam ainda canalículos de acúmulos glandulares situados junto ao esôfago e que constituem as glândulas salivares. Esôfago, extremamente curto, muitas vezes coberto por apêndices da parede intestinal. Ao esôfago estão anexas células glandulares denominadas glândulas esofagianas ou salivares. Cavidade intestinal ampla, terminada em fundo de saco, com vários recessos; apresenta seis paredes: a parede dorsal é a mais regular, plana, ou ligeiramente convexa para o dorso do animal; a parede ventral apresenta um grande recesso mediano, compreendido entre o faringe e o átrio genital, comunicando-se para frente com os dois recessos laterais anteriores e para trás com os posteriores; a parede anterior apresenta dois recessos pouco pronunciados, mais ou menos relacionados com as paredes laterais do faringe; a parede posterior apresenta igualmente dois recessos laterais, entre os quais se encontra o átrio genital; as paredes laterais direita e esquerda são côncavas em todos os sentidos, com a concavidade voltada para a luz do saco intestinal. Em preparados totais ou em cortes frontais, o intestino apresenta-se com a figura de altéres. Em cortes transversos a figura é diferente conforme a região em que foi feito o corte; os cortes que passam pelo faringe ou pelo átrio genital, dão ao intestino a figura de uma salchicha, emquanto os cortes que passam entre o faringe e o átrio genital dão-lhe um contôrno de elipse, achatada ventralmente. A face externa das paredes intestinais relacionam-se em toda a sua extensão com o vitelogênio. Posteriormente, a face inferior da cavidade intestinal, na altura do átrio genital, encontra-se intimamente relacionada com a face superior da vesícula reabsorvente de um lado, e do outro, com a glândula vesiculosa, respetivamente anexos do aparelho genital feminino e masculino. Lateralmente, através do parênquima, a cavidade intestinal põe-se em relação com os canais excretores. Látero-posteriormente, de ambos os lados, o saco intestinal põe-se em relação com os testículos e em particular com a face interna dos testículos anteriores. As dimensões do saco intestinal tambem estão sujeitas a ligeiras variações, sendo a largura prevalentemente superior às outras dimensões, tendo um valor praticamente igual ao dobro do comprimento ou da altura. O maior comprimento do saco intestinal é apresentado lateralmente, ao nível dos recessos laterais. Em média, encontramos 1,2 mm para a largura máxima, 0,48 mm para a altura, tomada a igual distância do faringe e do átrio genital e 0,5 mm para o comprimento, pelos polos dos recessos laterais anterior e posterior, respetivamente. A luz do saco intestinal apresenta-se extremamente irregular, devido à presença de numerosos septos, que aumentam consideravelmente a superfície intestinal. Os septos são grandes e partem particularmente das paredes laterais, existindo contudo tambem na parede posterior, aqui porém em menor número e mais baixos. Os septos das paredes laterais vão

decrescendo de altura, do meio para as extremidades; no meio são consideravelmente grandes, de modo que os de um lado ficam a pequena distância dos do lado oposto. A constituição de um septo é do mesmo tipo da parede intestinal: constam de um arcabouço músculo-conjuntivo, sôbre o qual repousa o epitélio intestinal. As paredes do saco intestinal constam de um esqueleto conjuntivo, que lhe forma uma verdadeira cápsula, na qual estão entremeadas fibras de tecido muscular. E' ao conjuntivo envolvente que o intestino deve as suas relações íntimas com o vitelogênio, pois o mesmo conjuntivo que envolve o saco intestinal vai embainhar os folículos vitelinos, que muitas vezes se encontram incrustados nas paredes intestinais. Revestindo internamente o saco intestinal encontramos um epitélio cilíndrico muito alto. As células são muito alongadas e de diâmetro relativamente pequeno. No polo basal da célula encontramos o núcleo, tendo um nucléolo evidente e em geral em posição excêntrica; o citoplasma é ligeiramente basófilo e de extrutura alveolar. Os limites entre os vários elementos celulares não são muito nítidos; êles repousam diretamente sôbre a cápsula de tecido conjuntivo que envolve o saco entérico. Entre os vários elementos do epitélio intestinal encontramos acúmulos de granulações fortemente eosinófilas, produzidas pelas glândulas grânulo-secretoras. Anexas às paredes intestinais encontramos células volumosas, de contôrno variável, piriformes, ovoidais, elipsoidais, ou às vezes com grandes prolongamentos, apresentando um núcleo muito grande, claro, homogênio, com nucléolo bem desenvolvido e de posição central; o citoplasma apresenta uma parte ligeiramente basófila, sendo no restante abarrotado de granulações eosinófilas, que constituem o seu princípio de secreção; são as chamadas glândulas grânulo-secretoras.

APARELHO GENITAL: é hermafrodita como os demais representantes do grupo. O conjunto de órgãos genitais está situado na metade posterior do corpo, exceto o vitelogênio, que envolvendo completamente o saco intestinal, avança um tanto anteriormente. Os órgãos ímpares do aparelho genital masculino encontram-se do lado esquerdo, emquanto os do feminino se localizam do lado direito. Os dois aparelhos terminam em um átrio genital comum, muito amplo. Súpero-lateralmente, do lado esquerdo, encontra-se o poro genital masculino, que dá passagem a um cirro grande e quitinoso; supero-lateralmente, à direita, encontra-se o poro genital feminino, que dá entrada a um metratermo curto e de paredes musculosas espêssas. Átrio genital, é uma cavidade relativamente ampla, tendo em média 0,20 mm de comprimento, 0,23 mm de altura e 0,60 mm de largura. Tem forma grosseiramente elipsoidal, achatada ventralmente. Apresenta a mesma constituição da parede corpórea, com a particularidade do epitélio sincicial que o reveste não possuir núcleos, apresentando cutícula pouco espêssa. O átrio encontra-se posteriormente, mais ou menos na união dos 3/5 anteriores com os 2/5 posteriores. Em sua parede ventral, anteriormente, há um orifício fendiforme de maior eixo transverso, que conduz ao canal atrial. O canal atrial apresenta a particularidade de possuir uma cutícula mais espêssa que a da cavidade atrial, além do que, no epitélio sincicial que reveste internamente suas paredes, distinguimos um grande número de núcleos, ao contrário do que sucede com o epitélio da cavidade do átrio. O canal atrial é em forma de um tubo de secção elíptica, com grande eixo dirigido transversalmente, apresentando-se um tanto mais alargado na porção voltada para a cavidade atrial. Apresenta em média um diâmetro transversal de cêrca de 60 micra e 20 micra de diâmetro longitudinal. Seu trajeto é praticamente vertical, apresentando uma



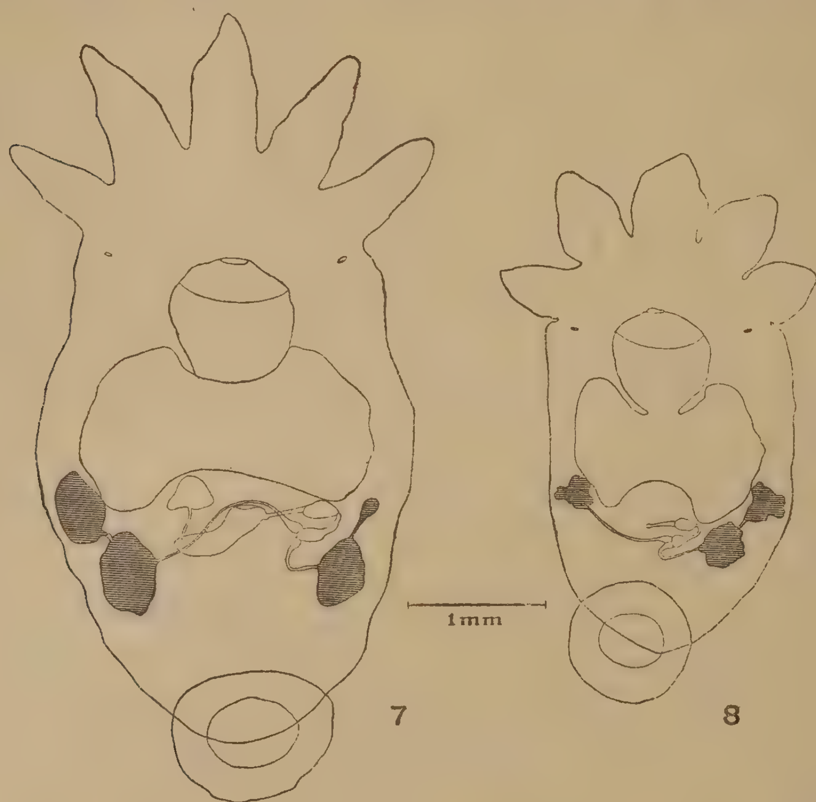

*Temnocephala brevicornis*: Fig. 5 - Complexo genital em toto-montagem. — Fig. 6 - Ovo. (RUTH DEL.)

altura média de 0,16 mm. mais ou menos. Ventralmente comunica-se com o meio exterior por intermédio do poro genital situado sôbre a linha mediana, em plano transversal mais anteriormente ao que passa pelos orifícios genitais masculino e feminino, colocados súpero-lateralmente na cavidade atrial. Em tôrno do poro genital ha uma forte condensação da musculatura; o poro genital apresenta a forma de uma fenda elíptica de maior eixo disposto transversalmente. O átrio genital relaciona-se com o saco intestinal por meio de sua parede anterior e, ainda, por meio da porção anterior das paredes laterais e superior. Ao átrio genital estão anexas as chamadas glândulas atriais: são células volumosas, podendo atingir até 80 micra de maior diâmetro; seu contôrno é mais ou menos uniforme, o corpo celular apresenta-se em geral aproximadamente globoso; da face que olha para a cavidade atrial partem prolongamentos delgados, à maneira de pequenos canalículos, os quais se insinuam no epitélio atrial. O seu citoplasma é alveolar e de eosinofilia mais ou menos acentuada. Apresentam um núcleo de cêrca de 12 micra de diâmetro, claro, sem afinidades cromáticas, possuindo um nucléolo esferoidal, central, de 4 micra de diâmetro e fortemente basófilo. O número destas células é prevalentemente superior na porção dorsal e posterior do átrio genital onde ordinariamente se dispõem em duas camadas superpostas, ao passo que ventralmente existe um só dêsses elementos.

Aparelho genital ♂: consta de dois pares de testículos volumosos, um anterior e outro posterior, sendo as dimensões dêste prevalentemente superiores às daquele. Os testículos são de contôrno um tanto irregular, com lobação não muito profunda, em geral elipsoidais, de grande eixo dirigido para trás e um tanto para dentro, sendo os posteriores mais obliquamente dirigidos que os anteriores. Estão situados na metade posterior do corpo, lateralmente, muito próximos das paredes laterais. Tanto dorsal como ventralmente as paredes testiculares ficam logo abaixo da camada muscular, ou dela são separadas por uma delgada camada de parênquima. Os testículos anteriores, pela face interna, estão intimamente relacionados com as paredes laterais do saco intestinal, emquanto as relações do par posterior com o saco intestinal dão-se principalmente pelo polo anterior. Os canais excretores, tanto à direita como à esquerda, bordejam a face interna dos testículos. Lateralmente aos testículos e, no intervalo compreendido entre o anterior e o posterior de cada lado, encontramos células volumosas, conhecidas com a denominação de glândulas cimentadoras. Os testículos são constituidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, de espessura variável (4 - 8 micra), relativamente pobre em células. As células da cápsula testicular são chatas, de contôrno irregular, estrelado quando vistas de face. Em cortes, essas células apresentam-se fusiformes, com 70 micra de comprimento e 8 micra de maior eixo transverso. As células anastomosam-se por meio de seus prolongamentos, deles partindo fibras relativamente delgadas, que vão constituir a cápsula testicular. No interior da cápsula encontramos elementos representativos de todas as fases da espermatogênese. As espermatogônias encontram-se em grandes acúmulos, constituidos por células tendo em média 6 micra de diâmetro e que, devido ao grande número e à juxtaposição, assumem um contôrno poliédrico; seu núcleo é central, volumoso, com a cromatina pulverulenta e o citoplasma resumido a pequena faixa de substância citoplasmática de tonalidade basófila. Os espermatocitos de primeira ordem são células maiores, de cêrca de 8 micra de diâmetro, de contôrno regular, mais ou menos esferoidal, com núcleo fortemente basófilo e de posição central. Os espermatocitos de segunda ordem

são mais alongados e de forma aproximadamente elipsoidal, com núcleo esférico, basófilo e central. As espermátides são pequenas, tendo um diâmetro de 4-5 micra e contôrno poligonal, irregular, com citoplasma muito claro e núcleo pequeno, fortemente basófilo, de forma esférica e diâmetro de cêrca de 2 micra. O núcleo da espermátide vai-se alongando em um dos polos de modo a adquirir a figura grosseira de um pequeno prego. A' medida que o núcleo se alonga, a cabeça vai-se adelgaçando, até chegar ao estado de espermatozóide. Os espermatozóides têm uma cauda muito longa e são extremamente delgados; atingem um comprimento de 25 micra e são dotados de uma cabeça muito pequena, de diâmetro quasi igual ao da cauda. Ductos intertesticulares: de cada lado, unindo o testículo anterior com o correspondente posterior, existe um ducto, relativamente curto, com a mesma constituição das cápsulas testiculares, dando a impressão de que o testículo, primitivamente único, aí sofreu uma forte estrangulamento. Seu comprimento é variável e dependente da distância que separa os dois testículos correspondentes. Seu diâmetro tambem não é constante, mas em média vai de 10 a 16 micras. Às vezes êle se alarga muito, próximo a um ou outro testículo, tomando, assim, o aspecto infundibuliforme. Seu trajeto é em geral retilíneo, dirigido para trás e para dentro; às vezes, porém, apresenta-se flexuoso, devido a uma aproximação dos dois testículos. Canais eferentes: são dois. Partem dos testículos posteriores, da metade anterior de sua face medial. O ducto da esquerda é muito mais curto, devido à situação do aparelho copulador masculino. Os ductos, ao partir dos testículos, são alargados à maneira de boca de funil, depois se estreitam e ficam com calibre mais ou menos uniforme, de cêrca de 10 a 15 micra de diâmetro, até à sua dilatação terminal. Antes da sua desembocadura na vesícula seminal os canais eferentes vão-se dilatando progressivamente, tomando um aspeto claviforme; nesse trecho o canal atinge um diâmetro máximo de 53 micra. As porções mais dilatadas dos canais eferentes funcionam como verdadeiras vesículas, onde se armazenam os espermatozóides. Os canais eferentes desembocam independentemente um do outro, por meio de um orifício circular, na base da vesícula seminal. O canal eferente da direita tem uma extensão superior ao dôbro do da esquerda, em média 1,31 mm de comprimento; descreve duas curvas no sentido ântero-posterior e uma outra de concavidade voltada para a direita e para cima. Parte do testículo posterior direito, com trajeto inclinado para trás e para dentro, com ligeiro deslocamento para cima, depois de pequeno trecho, encurva-se para a frente e para dentro, descrevendo, assim, uma primeira curva de concavidade anterior; segue nêste sentido, em direção ao átrio genital, passa por baixo dêste e atinge um nível anterior ao do poro genital, mais ou menos na linha mediana, muda de direção, voltando-se novamente para trás e para fora, descrevendo desta maneira uma nova e grande curvatura de concavidade posterior, passando agora por baixo do aparelho copulador masculino e, com direção ventro-dorsal, descreve uma curva de concavidade voltada para a direita e para cima, indo terminar na vesícula seminal. O canal eferente esquerdo é muito mais curto, tendo em média 0.50 mm de comprimento; parte do testículo posterior esquerdo, saindo com direção oblíqua para baixo, para trás e para dentro; após um pequeno trajeto, descreve uma grande curvatura de concavidade dorsal e, com percurso obliquo para cima e para dentro, vai terminar na base da vesícula seminal. As paredes dos canais eferentes são delgadas tendo mais ou menos 4 micra de espessura e são de natureza conjuntiva, semelhante à das cápsulas testiculares, contudo muito mais delgada; internamente são revestidos por um epitélio sincicial, baixo, cujos núcleos

são dificilmente evidenciáveis. V e s í c u l a  s e m i n a l, (= vesícula seminal externa) está situada na metade posterior esquerda do corpo do animal, tem uma direção oblíqua de baixo para cima, da direita para a esquerda e de diante para trás. E' mais ou menos piriforme, com a base voltada ventralmente e para a direita. Tem em média um comprimento de 0,34 mm e um diâmetro máximo de 0,08 mm. Desempenha um verdadeiro papel de reservatório de espermatozóides, encontrando-se sempre abarrotada dêstes elementos em estado maduro. Apresenta três orifícios comunicantes, dois na base, correspondentes aos dois canais eferentes




*Temnocephala brevicornis:* Fig. 7 - Atrofia do testículo anterior esquerdo. Fig. 8 - Falta do testículo posterior direito. (RUTH DEL.)

e um no ápice, donde parte o canal ejaculador. As suas paredes são de constituição análoga à dos canais eferentes, contudo um tanto mais espêssas (cêrca de 5 micra). Externamente existe uma pequena faixa de tecido conjuntivo e internamente um epitélio sincicial, da mesma natureza do que reveste os canais eferentes. C a n a l  e j a c u l a d o r : tubo cilíndrico, que parte da extremidade apical da vesícula seminal e, descrevendo uma curva de concavidade voltada para a esquerda e para trás, vai desembocar na glândula vesiculosa. Tem paredes pouco espêssas e um diâmetro de cêrca de 0,025 mm. G l â n d u l a  v e s i c u l o s a,

(vesícula seminal interna), situada na base do cirro, tem a forma de um elipsóide de 0,20 mm de comprimento e 0,12 mm de diâmetro máximo transverso. Apresenta externamente um envoltório músculo-conjuntivo de 4-5 micra de espessura e internamente um epitélio glandular muito espêsso. A luz da glândula é muito enfractuosa e cheia de criptas, devido às irregularidades do epitélio. Desempenha exclusivamente o papel de glândula e nunca o de uma vesícula "in sensu strictu" pois no seu interior nunca se observa o armazenamento de espermatozoides. Da parede dorsal do corpo partem fibras musculares, que se sistematizam à maneira de verdadeiros músculos que, com trajeto oblíquo para baixo e para dentro, ligam a glândula à parede dorsal do corpo. Aparelho copulador constituido por um cirro quitinoso e de grandes dimensões. Tem a forma de um cone muito alongado, de altura de 0,36 mm e diâmetro de 0,10 mm na base e 0,04 no ápice. A sua extremidade distal dilata-se um tanto, tomando o aspecto de uma pequena ampola. Tem as paredes quitinosas, não muito espêssas e uma luz ampla. Está dirigido ventralmente para dentro e um tanto para trás. Termina súpero-lateralmente na cavidade do átrio genital. Está contido na bolsa do cirro, que é um envólucro músculo-conjuntivo; suas fibras musculares tomam a mesma direção do cirro e permitem-lhe a retractibilidade. Na superfície interna da extremidade distal do cirro ha uma corôa de espículos, constituida por várias fileiras longitudinais de pequenos espinhos quitinosos, superpostos e com direção oblíqua, com as pontas voltadas para a abertura distal do cirro.

Anomalias: em alguns dos nossos exemplares foi possível verificar as seguintes variações: a) testículo anterior esquerdo atrófico, de dimensões diminutas e sem a extrutura típica testicular; b) falta total do testículo posterior direito e, consecutivamente, o canal eferente da direita nascendo diretamente do testículo anterior correspondente; finalmente um exemplar apresentava tres testículos do lado direito.

Aparelho genital ♀: tem uma situação posterior, do lado direito do corpo do animal, com exceção do vitelogênio, que é bilateral e ocupa o terço

TABELA: 4

Testículos, comprimento × largura em milímetros

| | Esquerdo | | Direito | |
|---|---|---|---|---|
| | Anterior | Posterior | Anterior | Posterior |
| 1 | Atrófico (sem figuras de espermatogênese) | 0,55 × 0,30 | 0,43 × 0,32 | 0,59 × 0,35 |
| 2 | 0,49 × 0,26 | 0,50 × 0,40 | 0,40 × 0,26 | 0,59 × 0,35 |
| 3 | 0,40 × 0,24 | 0,38 × 0,34 | 0,36 × 0,28 | 0,47 × 0,27 |
| 4 | 0,36 × 0,20 | 0,50 × 0,36 | 0,30 × 0,27 | 0,43 × 0,34 |
| 5 | 0,30 × 0,22 | 0,34 × 0,30 | 0,26 × 0,24 | Falta |
| 6 | 0,38 × 0,18 | 0,38 × 0,24 | 0,22 × 0,20 | 0,43 × 0,30 |
| 7 | 0,30 × 0,20 | 0,40 × 0,24 | 0,32 × 0,20 | 0,36 × 0,26 |
| 8 | 0,26 × 0,20 | 0,30 × 0,26 | 0,30 × 0,16 | 0,28 × 0,26 |
| 9 | 0,22 × 0,18 | 0,30 × 0,20 | 0,30 × 0,18 | 0,32 × 0,22 |
| 10 | 0,34 × 0,18 | 0,34 × 0,24 | 0,30 × 0,16 | 0,28 × 0,22 |

médio do corpo, envolvendo por todos os lados o saco intestinal. O v á r i o relativamente pequeno e com número escasso de óvulos. Forma globosa ou ligeiramente ovoide. Está situado posteriormente, mais ou menos na união dos 2/3 anteriores com o têrço posterior do lado direito e deslocado dorsalmente. Está para trás da vesícula reabsorvente, à direita do ootipo e para cima da cavidade atrial. Dimensões pouco variáveis, em geral apresentando um diâmetro médio de 0,15 mm. O órgão possue caudalmente uma pequena porção mais delgada que se dirige para o oviducto. Internamente apresenta um orifício que o põe em comunicação com o oviducto; êsse orifício apresenta um contôrno circular, de diâmetro médio de 50 micra e encontra-se voltado para baixo, para trás e um tanto para a direita. Envolvendo o ovário existe uma cápsula ovárica muito delgada, de espessura mais ou menos uniforme em toda a sua extensão, com um valor médio de 3 micra. A cápsula ovárica é de natureza conjuntiva, com fibras muito delgadas e reunidas compactamente; tem uma extrutura pobre em celulas, encontrando-se um ou outro elemento celular disperso; estes elementos celulares conjuntivos são de contôrno irregular, estrelado, fusiformes quando vistos em corte; são células relativamente grandes, tendo o corpo celular, em média, um diâmetro de 25-30 micra e, como a expessura da célula é consideravelmente superior à da cápsula ovariana, nos pontos em que se encontram as células capsulares, a superfície do ovário torna-se ligeiramente bosselada. Os elementos celulares da cápsula ovariana encontram-se anastomosados por meio de prolongamentos. Seu citoplasma é homogênio; apresentam um núcleo elipsoidal, grande, central, de 12 micra de eixo longitudinal e 6 micra de eixo transverso, cora-se fracamente e, em posição central, apresenta um nucléolo esferoide, pequeno, de 2 micra de diâmetro, dotado de grande afinidade pelos corantes básicos. Os óvulos, no interior do ovário, são de dimensões variáveis conforme o estado de desenvolvimento, e em número relativamente pequeno. Constam de uma porção citoplasmática mais ou menos ovoide, de cujo polo mais delgado parte um prolongamento, à maneira de pedúnculo; êste prolongamento vai-se adelgaçando progressivamente, até cêrca da metade de sua extensão, para depois tornar a alargar-se gradativamente, até o seu pé de implantação, de modo a adquirir o aspecto de uma ampulheta muito alongada. O corpo celular, de forma ovoide, tem, em média, um eixo longitudinal de 65 micra e um eixo transverso de 25 micra. Possue um grande núcleo central, que pode atingir até 40 micra de comprimento e 20 micra de largura, de forma elipsoidal ou ligeiramente ovoide, com o polo agudo voltado para o pedúnculo; claro, vesiculoso, de afinidades cromáticas muito pouco acentuadas e tendentes à basofilia, possue, em posição central ou ligeiramente excêntrico, um nucléolo, globoide, de 8 micra de diâmetro e fortemente basófilo. O citoplasma reduz-se a uma pequena faixa envolvente do núcleo, dotada de basofilia mais ou menos acentuada, contudo não uniforme, distinguindo-se porções mais claras e porções mais escuras. O pedúnculo é constituido por substância citoplasmática, medindo 60-70 micra de comprimento; o diâmetro transversal do pedúnculo é variável, medindo em média 12 micra nas porções polares, tanto proximal como distal, e 4 micra na porção mais estreita, que fica sensivelmente na parte média do pedúnculo. Na periferia do óvulo, tanto no corpo celular como no pedúnculo, o citoplasma encontra-se condensado em uma tênue camada de espessura uniforme em toda a sua extensão, dotada de basofilia muito acentuada. Em alguns pontos do citoplasma dos óvulos, principalmente no pé do pedúnculo, encontram-se granulações esferoidais, eosinófilas, de cêrca de um micron de diâmetro. O v i d u c t o : tubo cilíndrico, relativamente curto, parte do ovário ínfero-

posteriormente e um tanto à esquerda, indo abrir-se no ootipo, próximo da abertura vitelina. Partindo do ovário, com direção oblíqua, logo se encurva fortemente, descrevendo um joelho e tomando uma direção horizontal. Tem um comprimento de cêrca de 120 micra, apresentando um diâmetro de 35-40 micra, assás uniforme em toda a extensão, apresentando uma parede de espessura de 4 micra, igual em toda a extensão do órgão. A parede é constituida por um envólucro conjuntivo pouco espêsso, formado por uma condensação de fibras da mesma natureza das que se encontram na cápsula ovárica. Internamente o oviducto é revestido por uma lâmina delgada e hialina, desprovida de núcleos. O oviducto abre-se no ootipo por meio de um orifício circular de cêrca de 35-40 micra de diâmetro. O o t i p o: tubo cilíndrico, longo e delgado, que se estende da vesícula reabsorvente ao metratermo. Está do lado direito, na porção posterior do corpo, em situação dorsal. Apresenta um comprimento de cêrca de 280 micra e uma largura de cêrca de 40-50 micra. Dirige-se para trás, para fora e um tanto dorsalmente, num trajeto quasi retilíneo; próximo a extremidade distal encurva-se bruscamente para se abrir no metratermo, em direção dorso-ventral. Apresenta duas aberturas polares, a anterior em comunicação com a vesícula reabsorvente e a posterior com o metratermo. Na porção média do ootipo encontram-se duas outras aberturas, a do oviducto e a dos viteloductos. Na parte alta do ootipo encontram-se tambem aberturas que se põem em comunicação com formações em fundo de saco: os r e c e p t á c u l o s s e m i n a i s. O trecho proximal do ootipo, compreendido entre a abertura da vesicula reabsorvente e a abertura do oviducto, apresenta certas diferenças de extrutura com o trecho distal, principalmente a falta de uma túnica média muscular bem desenvolvida. Externamente, o tecido conjuntivo ambiente se condensa em tôrno do órgão, internamente reveste-o uma lâmina epitelial baixa, e na túnica média existe uma musculatura bem desenvolvida. M e t r a t e r m o (= vagina), consta de um tubo curto, de cêrca de 150 micra de comprimento, muito largo, tendo um diâmetro externo de cêrca de 125 micra; é em forma de tronco de cone, com a base voltada para cima e em direção dorso-ventral; na base encontra-se um orifício circular onde chega o ootipo, e no ápice, truncado, voltado ventralmente, está o orifício vaginal externo, aberto na cavidade atrial, em seu ângulo súpero-lateral direito. E' órgão essencialmente musculoso. Ao nível dos dois orifícios é provido de poderosos esfíncteres. O esfincter inferior, menor, apresenta uma secção elíptica, com grande e pequeno eixos medindo respectivamente 40 e 30 micra. O esfincter superior é de proporções maiores, contudo menos compacto. Na parede do órgão, na porção compreendida entre os dois esfíncteres, existe uma camada muscular bem desenvolvida, de 16 micra de espessura, constituida por fibras musculares grossas e anelares. Externamente existe uma adventícia conjuntiva muito tênue. Internamente um epitélio sincicial alto. A luz do órgão é diminuta, principalmente quando consideramos o seu diâmetro externo. Apresenta-se como um fuso muito achatado, tendo um diâmetro máximo de 40 micra, que se reduz progressivamente do equador para os polos e, ao nível da abertura genital feminina na cavidade atrial, passa a um diâmetro de 16-20 micra. R e c e p t a c u l o s s e m i n a i s : pequenas bolsas destinadas a receber os espermatozóides, colocadas logo abaixo da abertura da vesícula reabsorvente no ootipo. São piriformes, dispostas perpendicularmente em relação ao eixo do ootipo. Apresentam uma porção estreitada que se abre no ootipo, e outra, dilatada em ampola, mergulhada no parênquima ambiente. Suas paredes têm constituição idêntica à do ootipo, do qual elas nada mais são que simples evaginações. Apresentam em média 25 micra de comprimento e 18-20 micra de maior

diâmetro transverso. Anexos ao aparelho genital feminino: Vesícula reabsorvente (= *vesicula resorbiens*) grande vesícula de contôrno externo muito irregular, tendo grosseiramente forma semiesférica, com a base voltada posteriormente. Encontra-se posteriormente, do lado dorsal direito, em íntimas conexões com o saco intestinal, fazendo mesmo saliência na luz do intestino. Apresenta em geral uma altura de 0,2 mm e, na base, um diâmetro de 0,3 mm. A luz da vesícula é elipsoidal, tendo um grande eixo dirigido transversalmente, com 0,12 mm e um pequeno eixo, no sentido ântero-posterior, de cêrca de 0,10-0,15 mm. A parede da vesícula é muito delgada na porção polar que se encontra voltada para a cavidade do saco intestinal, enquanto é consideravelmente espêssa em sua porção basal, voltada posteriormente. As paredes são constituidas por um grande sincício. O citoplasma é basófilo e os núcleos, elipsoidais ou subesféricos, encontram-se na parte látero-inferior da vesícula. Na luz da vesícula, frequentemente distinguem-se espermatozóides esparsos sôbre um acúmulo de substância amorfa e que parece constituida por restos de produtos secretados pelas células glandulares anexas ao aparelho genital feminino. Outras vezes a luz da vesícula apresenta-se completamente vazia, e em alguns exemplares ela se encontra cheia de espermatozoides. Vitelogênio, com os folículos vitelinos formando uma grande rede anastomótica, que envolve o saco intestinal em todos os sentidos e que com êle contrai relações muito estreitas, de tal modo, que os folículos vitelinos encontram-se muitas vezes incrustados no epitélio intestinal. São envolvidos pela mesma cápsula de tecido conjuntivo que envolve o saco entérico. Envolvendo completamente o intestino, a rede vitelina forma em tôrno dêsse órgão uma espécie de gaiola que se apresenta com a mesma conformação que vimos para o intestino. Ocupa o têrço médio do corpo, entrando lateralmente em relação com as glândulas grânulo-secretoras, anexas ao aparelho digestivo e com as glândulas cimentadoras, anexas ao aparelho genital feminino. As células vitelinas são mais ou menos volumosas e de contôrno um tanto irregular. Apresentam citoplasma basófilo, dotado de zonas mais claras alternando com zonas escuras. O núcleo é esferoidal, fortemente basófilo, com um nucléolo muito pequeno, esférico, em posição central. Existem dois viteloductos, um à direita e outro à esquerda. São dois tubos cilíndricos, de paredes muito delgadas e de percurso retilíneo, com ligeira inclinação para dentro e para trás, encontrando-se sempre cheios de células vitelínicas. Próximo ao ootipo, abaixo da vesícula reabsorvente, êles se reunem e formam um tubo único, muito curto, que por meio de um orifício circular se abre no ootipo. Glândula da casca: de perfil semi-lunar, volumosa, à direita do ootipo. E' envolvida por uma cápsula conjuntiva pouco espêssa. Os elementos glandulares são abundantes, de contôrno irregular e limites mal definidos. O citoplasma é irregularmente basófilo. Núcleo esferóide, de 8 micra de diâmetro, corando-se fracamente e apresentando um nucléolo intensamente basófilo, de forma esférica, de 4 micra de diâmetro e em posição central. Por meio de um curto canal a glândula abre-se no ootipo. Glândulas do ootipo: elementos unicelulares não reunidos numa glândula propriamente dita, encontrando-se ao redor da porção distal do ootipo. São células, em geral fusiformes ou piriformes, muito alongadas, dotadas de um prolongamento muito fino e longo que caminha em direção do ootipo. Atingem até 60 micra de comprimento e têm o maior eixo transverso de 16-20 micra. O citoplasma é basófilo e a sua secreção eosinófila. O núcleo é central, elipsóide, de 8 micra de comprimento e dotado de nucléolo esferoide, em posição central. O prolongamento é longo e fino, partindo do ápice, que olha para o ootipo, penetra na parede dêste órgão, atinge a luz dêle,

onde lança a sua secreção, que provavelmente atua como um lubrificante do ootipo. Glândulas cimentadoras (= *Kittdrüsen*): tambem elementos glandulares unicelulares, assás numerosas e de dimensões avantajadas. Êstes elementos dispõem-se lateralmente, de ambos os lados do corpo do animal, imediatamente subjacentes à camada muscular, indo desde a zona testicular até a linha do limite anterior do saco entérico, encontrando-se encostados uns aos outros, penetrando no espaço compreendido entre os dois testículos de cada lado e, na região lateral ao saco intestinal, relacionam-se mais ou menos intimamente com as glândulas grânulo-secretoras, anexas àquele aparelho. O contôrno destas células é muito variável, globoide, piriforme, fusiforme, elipsoide ou ovoide. Podem atingir até 100 micra de diâmetro máximo. O citoplasma é constituido por fina rede basófila em cujas malhas se notam frequentemente áreas eosinófilas. Possuem um núcleo central, esférico ou ligeiramente ovoide, claro, situado no meio da massa citoplasmática. No núcleo encontra-se nucléolo, ligeiramente excêntrico, intensamente basófilo, esferoidal, de 4 micra de diâmetro. O produto de secreção destas células é lançado em delgados canalículos, muito numerosos, que da região glandular, e através do parênquima se vão abrir na porção distal do ootipo e partes circunvizinhas da cavidade do átrio genital. A sua secreção teria por função colar os ovos à superfície do hospedeiro.

## DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E HOSPEDEIROS

Esta espécie foi nomeada por MONTICELLI (1889) e por êle descrita em 1898, de um cágado, proveniente de indeterminada região do Brasil.

MERTON (1922) reestuda esta espécie, em material colhido no Brasil por BRESSLAU em 1913, considerando-o como sub-espécie de *brevicornis*, o que já demonstramos ser insustentável. Êste autor faz mais confusões lamentáveis em seu trabalho: a primeira ao localizar Terezópolis no Estado de Santa Catarina e a segunda, ao incluir entre os hospedeiros de seu material *Mesoclemmys gibba* (SCHWEIGG) (= *Hydraspis gibba* SCHW.).

Consultamos o relatório da viágem feita ao Brasil, em 1913-1914, por BRESSLAU (1927), e aí verificamos que êste zoólogo só visitou o Brasil de S. Paulo para o norte e, mais ainda, que Terezópolis, onde colheu material de *Temnocephala*, é na Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro e não em Santa Catarina como refere MERTON. Quanto ao hospedeiro, diz BRESSLAU ser *Hydromedusa maximiliani* (MIK.), muito abundante no rio Paquequer, não fazendo referência alguma a outras espécies ou gêneros de cágados nos quais tenha encontrado espécies de *Temnocephala*.

MUELLER (1927) ao publicar os resultados do estudo dos Anfíbios e Répteis colecionados durante a mesma viágem, cita vários exemplares de *H. maximiliani* colhidos em Terezópolis, na Serra dos Órgãos e apenas um exemplar de *H. tectifera* COPE, êste porém de

Piassaguera, Estado de São Paulo, localidade de onde não havia sido obtido material de *Temnocephala.* Não encontramos explicação satisfatória para o fato de MERTON (1922) incluir *Mesoclemmys gibba* entre os hospedeiros de *T. brevicornis.*

BAER (1931) cita *Hydromedusa platanensis* GRAY, como um dos hospedeiros de *T. brevicornis;* essa espécie é sinónimo de *H. tectifera.*

Em resumo, são as seguintes as indicações seguras sôbre hospedeiros e respectivas localidades onde *T. brevicornis* foi assinalado até o momento:

Localização: sôbre o plastrão e a pele das regiões axilar, inguinal e anal.

Hospedeiros:

*Hydromedusa maximiliani* (MIK.)

Procedência: Terezópolis e Angra dos Reis (Estado do Rio de Janeiro) e Viçosa (Estado de Minas Gerais) — Brasil.

*Hydromedusa tectifera* COPE.

Procedência: São Paulo (Estado de S. Paulo) — Brasil.

*Mesoclemmys gibba* (SCHW.) (= *Hydraspis gibba* SCHW.).

Procedência: Brasil. (segundo MONTICELLI, 1899).

*Platemys radiolata* (MIKAN) (= *Hydraspis radiolata* MIKAN).

Procedência: Brasil, (segundo MONTICELLI, 1889 e HASWELL, 1893).

## BIONOMIA

Todas as tentativas feitas para manter *T. brevicornis* sôbre seu hospedeiro, em cativeiro, deram resultados negativos; ao fim de poucos dias dava-se o desaparecimento gradual dos platelmintos.

Foi então experimentada sua criação em pequenos aquários, no laboratório, baseados no fato de WEBER, 1889, e CHILTON, 1899 terem conseguido demonstrar a possibilidade de *T. semperi* WEBER, 1899, e *T. novae-zelandiae* HASWELL, 1887, respectivamente poderem permanecer com vida fóra do hospedeiro, em pequenos aquários.

Usamos para tal fim um cristalizador de 13,5 cm. de diâmetro por 12 cm. de altura, com água mantida a 9 cm. de altura, tendo em sua superfície alguns exemplares de plantas dos gêneros *Lemna e Salvinia.*

Como os córtes histológicos realizados em nosso material revelassem no saco intestinal dos platelmintos restos de Copépodos e de larvas de Dípteros que pudemos reconhecer pelo aspecto da glândula salivar, provimos o aquário com numerosos exemplares de *Cyclops* sp.

e *Cypris* sp., além de duas desovas de *Culex quinquefasciatus,* cujas larvas saíram no dia seguinte.

Verificamos, porém, que nas condições de experiência, começou a manifestar-se mortalidade acentuada no material, o que atribuimos a três motivos principais:

a) — necessidade de substituição diária da água;

b) — inhabilidade do platelminto para alimentar-se por sua iniciativa à custa dos alimentos postos à sua disposição;

c) — importunação insistente produzida principalmente pelos *Ostracoda,* como tambem pelos *Copepoda.*

Como a princípio mudássemos a água do aquário apenas cada quatro a cinco dias, notava-se que os temnocéfalos tendiam a ficar imóveis, aglomerando-se em qualquer ponto do fundo ou da parede do aquário. Logo que a água era mudada êles tornavam-se bastante ativos, pondo-se a caminhar em todos os sentidos. Com a substituição diária da água foi possivel mantê-los ativos e, para interromper seus períodos de repouso, era suficiente provocar pequena agitação na água.

Durante os primeiros dias notou-se que o saco intestinal parecia tornar-se cada vez mais claro, o que indicava o seu esvasiamento, ao passo que os temnocéfalos faziam esforços desesperados para se apoderar principalmente das larvas de mosquitos, raramente conseguindo o intento.

Em vista dêsse fato, começamos a alimentá-los com pequenos fragmentos de um *Tubificidae,* do qual possuimos criação.

Sempre que um dêsses fragmentos era posto junto a um temnocéfalo, tanto no fundo como na parede do aquário, o temnocéfalo aplicava-se por sua face ventral sôbre êle, contra a superfície na qual estava apoiado, exercendo uma sucção que levava o fragmento atravéz da bôca, para seu saco intestinal.

Uma vez realizada tal operação, permanecia o animal em repouso, com o dorso fortemente convexo, por tempo mais ou menos variavel, após o que, era frequente regorgitar o material ingerido, às vezes tornando a enguli-lo novamente, podendo estas operações ser repetidas diversas vezes.

Finalmente, era frequente o temnocéfalo abandonar o envólucro do oligoqueta, depois de chupar as porções mais flúidas do fragmento utilizado. O animal alimentado tinha seu saco intestinal dese-

nhado com muita nitidez em côr vermelho-suja sôbre o fundo branquicento de seu corpo.

Uma vez eliminados os crustáceos do pequeno aquário, os temnocéfalos deixaram de ser importunados, podendo repousar tranquilamente nos intervalos entre as refeições.

A manutenção dos temnocéfalos tornou-se possivel à custa de tais cuidados, tanto que êles iniciaram a postura de ovos, que ficavam aderentes já à parede do aquário, já às partes submersas das plantas flutuantes.

Posteriormente, conseguiu-se uma simplificação da técnica de cultura fazendo-se a criação dos temnocéfalos em conjunto com uma criação de oligoquetas da família *Naididae*. Verificou-se que, desta maneira, os temnocéfalos eram capazes de se alimentar sôbre as minhoquinhas muito novas, dispensando a necessidade de os alimentar um por um como se fazia inicialmente. Para estimular o crescimento dos oligoquetas, punham-se pequenos pedaços de folhas de couve no aquário, que se tornavam centros de produção de bactérias e por isso eram muito procurados pelas minhoquinhas, que tambem comiam as algas unicelulares desenvolvidas nêsse ambiente.

Um aspecto típico do comportamento dêsses temnocéfalos reside no seu processo de locomoção. Como diferença dos turbelários, verifica-se a impossibilidade de nadar, mesmo apoiando-se na pelicula de tensão superficial da água. Locomovem-se sistematicamente apoiados sôbre um substrato sólido, seja o fundo ou as paredes do aquário, ou então as partes submersas das plantas flutuantes.

Quando, atravéz de uma agitação da água, são tirados da posição de repouso, que consiste em ficarem encolhidos, com os tentáculos muito encurtados, fixos ao substrato pelo acetábulo, sua primeira reação consiste em traçar repetidos arcos de círculo, às vezes circunferências, com o corpo em meia distensão, em tôrno de um eixo que passaria pelo centro do acetábulo. Êstes movimentos podem tornar-se mais complexos por se combinarem com distensões e retrações do corpo, seu afastamento da superficie de apoio, excepto pelo acetábulo, e agitação dos tentáculos.

Depois dêsse periodo como de tacteação, si a excitação não foi muito forte pode haver uma volta à posição de repouso, seja no mesmo lugar ou em um ponto próximo.

Sendo mais forte a excitação, o animal põe-se a caminhar "medindo palmos", como sanguessuga, apresentando geralmente tendência para subir, embora possa caminhar em qualquer sentido.

Conseguem alcançar a vegetação flutuante quando esta encosta na parede do aquário, podendo então permanecer em suas partes submersas.

Os temnocéfalos nunca estacionam junto à superficie dágua, na parede do aquário, ficando sempre alguns milímetros abaixo, nem foram nunca vistos saír para fóra dágua.

Quando destacados da superfície em que apoiam, cáem lentamente para o fundo, contorcendo-se largamente e agitando os tentáculos, não se notando tendência alguma para se contrairem durante a queda.

Nossos trabalhos começaram a 31 de janeiro de 1940 com pouco mais de uma vintena de exemplares vivos, número que em menos de um mês estava reduzido a cêrca de metade, devido à falta de experiência no manuseio de tal material.

Depois a mortalidade reduziu-se muito, ficando mais limitada aos exemplares colocados em condições precárias de vida, afim de ser observado melhor o comportamento durante a postura, ou então, limitando-se aos inevitáveis acidentes da manipulação.

O último exemplar morreu a 10 de abril do mesmo ano, tendo, portanto uma sobrevivência, em aquário, de 71 dias, ao passo que sôbre o hospedeiro normal em cativeiro foi impossivel mantê-los por mais de uma semana, acabando todos por desaparecer, sem que fosse possivel perceber como.

As observações feitas em aquário vieram mostrar que os fenômenos de desintegração cadavérica são muito rapidos nêste animal, pois de um dia para outro torna-se difícil o reconhecimento do cadaver, que se confunde perfeitamente com detritos do fundo do aquário.

O estudo das condições de desóva e desenvolvimento dos recem-nascidos foi feito parte no aquário e parte em pequenas placas de Petri de cêrca de 2 cms. de diâmetro, que exigiam cuidados muito maiores para se conseguir a sobrevivência dos indivíduos. Seus resultados são sumariados na tabela 5.

Os ovos são postos geralmente na parede do aquário, mais raramente no fundo ou nas partes submersas das plantas flutuantes; ficam aderentes por sua extremidade possuidora de filamento, por meio de uma substância que exerce função de cola muito eficiente, de tal modo que é relativamente difícil destacá-los do lugar onde foram postos.

TABELA: 5

Observações bem controladas

| N.os | Data da Postura | Data do Nascimento | Tempo de Incubação | Data da Morte | Tempo de Sobrevida |
|---|---|---|---|---|---|
| n.º 1 | 15 — 2 | 4 — 3 | 18 dias | 9 — 3 | 5 dias |
| | 17 — 2 | — | — | — | — |
| n.º 2 | ? | 27 — 2 | ? | 4 — 3 | 6 dias |
| | ? | — | — | — | — |
| n.º 3 | — | — | — | — | — |
| n.º 4 | 14 — 2 | 27 — 2 | 13 dias | 6 — 3 | 8 dias |
| | 14 — 2 | 27 — 2 | 13 dias | 6 — 3 | 8 dias |
| | 14 — 2 | 27 — 2 | 13 dias | 6 — 3 | 8 dias |
| n.º 5 | 15 — 2 | 27 — 2 | 12 dias | 8 — 3 | 10 dias |
| | ? | — | — | — | — |
| n.º 6 | ? | — | — | — | — |
| | ? | — | — | — | — |
| | ? | — | — | — | — |
| | ? | — | — | — | — |
| n.º 7 | ? | 20 — 3 | ? | 1.º — 4 | 12 dias |
| | ? | 30 — 3 | ? | 14 — 4 | 15 dias |
| n.º 8 | ? | 2 — 4 | ? | 4 — 7 | 93 dias |

EXPLICAÇÃO DA TABELLA 5

N.º 1 — Um exemplar de *T. brevicornis* isolado em 13 - 2, pôs 3 ovos dos quais 2 goraram.

N.º 2 — 2 ovos retirados da parede do aquário; 1 gorou.

N.º 3 — Um exemplar de *T. brevicornis;* não pôs ovos.

N.º 4 — 3 ovos retirados da parede do aquário.

N.º 5 — Um exemplar de *T. brevicornis;* pôs 1 ovo.

N.º 6 — 5 ovos retirados do fundo do aquário; todos goraram.

N.º 7 — 2 recemnascidos do aquário, criados junto com as minhocas e alimentados nos dois primeiros dias com pequenos fragmentos de minhoca.

N.º 8 — Nascido no aquário e criado junto com as minhocas; não teve alimentação artificial.

A côr inicial dos ovos recempostos é alaranjada, com tendência a escurecer progressivamente, passando para castanho-claro, depois mais escuro, até tornar-se bem escuro. A casca é bastante opaca para não permitir que seu conteúdo seja examinado ao microscópio.

Depois do período de incubação, que em nossas condições de experiência variou de 12 a 18 dias, destacava-se um opérculo terminal na extremidade livre do ovo, por onde saía o animal recemnascido,

com pouco menos de 1,5 mm. de comprimento, apresentando toda a morfologia externa característica da espécie, guardadas as respectivas proporções, de modo a dispensar-nos da necessidade de representar seu aspecto. O desejo de criar êsses recemnascidos impediu-nos de sacrificá-los para apreciar detalhadamente o desenvolvimento de sua morfologia interna, que aliás em exames a fresco nada sugeriu de particular.

Os ovos que se revelaram inviáveis não apresentavam característico algum especial, a não ser o de ficarem envolvidos pela trama de um fungo relacionado com o gênero *Saprolegnia*, como tambem por não apresentarem o orifício de saida do recemnascido. Quasi a metade dos ovos postos goraram em nossas condições de experiência.

Os recemnascidos passavam a demonstrar apetite depois do terceiro dia de eclosão, interessando-se vivamente pelos pedacinhos de minhocas; assumiam a mesma atitude que os adultos em relação ao alimento, nem sempre conseguindo enguli-lo; antes do emprêgo dos fragmentos de minhocas foram ensaiados pedacinhos de carne, pequeninos coágulos de sangue, pequenos blocos de agar com caldo de carne, pequenos coágulos de clara de ovo, tudo porém inutilmente, sendo os melhores resultados conseguidos na alimentação artificial, os obtidos com pedacinhos de minhocas.

Aproveitando a preferência demonstrada pelos temnocéfalos para alimentarem-se do oligoquetas aquáticos, reforçada pelo fato de serem os cágados recobertos frequentemente por uma fauna e flora muito apreciaveis, onde existem tambem oligoquetas, experimentamos associar no mesmo aquário a criação de temnocéfalos conjugada com a dêsses oligoquetas.

Os resultados foram excelentes, devendo-se lamentar apenas que essa experiência se tivesse iniciado quando as perdas de indivíduos já eram tão grandes.

Na tabela 5 pode ser apreciado o fato de o indivíduo da observação n.º 8 ter-se criado alimentando-se por sua própria iniciativa, de tal maneira que com 1 mês de idade tinha alcançado cêrca de metade do desenvolvimento normal da espécie, continuou a apresentar um comportamento perfeitamente normal e, tendo vivido 93 dias.

Não tivemos oportunidade de verificar exatamente em nosso material, as observações feitas por HASWELL, 1893, em *T. dendyi* HASWELL, 1893, e em *T. novae-zelandiae* HASWELL 1887, a respeito da existência de canibalismo. A julgar pela grande homogeneidade do

gênero, entretanto, certos "desaparecimentos" de indivíduos novos que se deram algumas vezes, provavelmente podem ser atribuidos a essa causa e não simplesmente à inabilidade em descobrir seus cadáveres, como foi admitido a principio.

## ECOLOGIA

Como o conteúdo do intestino de *T. brevicornis* acusava um regime alimentar não diretamente dependente do seu hospedeiro, o que, aliás, já havia sido verificado para outras espécies do mesmo grupo, ficava pouco evidente qual o mecanismo da especificidade que liga êste platelminto aos cágados.

Si apenas admitíssemos a existência de uma coação-abrigo em relação aos cágados, característica de inquilinismo, permaneceria obscuro o motivo pelo qual coações dêste tipo não se manifestariam, também, em relação a outros vertebrados e invertebrados habitantes de água dôce.

Tivemos a oportunidade de verificar a possibilidade de *T. brevicornis* instalar-se, em aquário, sôbre *Physa* sp., mas apenas em carater transitório, puramente ocasional, do mesmo modo como podiam permanecer tambem sôbre partes submersas de plantas aquáticas, ou contra a parede do aquário.

Por outro lado, os oligoquetas estariam ligados aos cágados, diretamente por meio de uma coação-abrigo e, indiretamente, por uma coação-alimento, pois o ambiente periférico ao quelônio seria propício ao desenvolvimento dos microorganismos sôbre os quais se alimentam as minhoquinhas.

Portanto, a observação da presença de oligoquetas sôbre cágados, além de outros tipos animais de hábitos correlatos, e a demonstração da possibilidade de se criarem temnocéfalos simultaneamente com e à custa de oligoquetas, trouxeram luz apreciavel sôbre uma coação-alimento, capaz de emprestar maior gráu de aproximação ao interpretarmos as relações da comunidade *Temnocephala-Chelydae-Naididae.*

Os *Chelydae*, família a que pertencem os cágados neotrópicos, são ainda muito mal conhecidos no que diz respeito aos seus hábitos, de tal modo que é praticamente impossivel termos um terreno seguro sôbre o qual se possa discutir o real papel representado por êsse discreto teatro da coação-alimento dos temnocéphalos relativamente às minhocas.

Pudemos observar nos exemplares de *Hydromedusa tectifera* que mantivemos durante muito tempo em cativeiro, num trecho telado de córrego, que êstes animais costumam passar o dia todo mergulhados no lôdo do fundo; nunca tivemos a oportunidade de verificar sua locomoção espontânea durante o dia, pelo que somos forçados a admitir que êles desenvolvam suas atividades predatórias principalmente durante a noite.

Naturalmente, seus largos períodos de imobilidade no fundo das águas rasas, fazem-no constituir um excelente ponto de apôio para o exercício de um verdadeiro comensalismo por parte dos oligoquetas, e tambem das larvas aquáticas de dípteros, que encontram abrigo e alimentação abundante sôbre êstes quelônios, ao mesmo tempo que servem de objetivo para exercício do predatismo por parte dos temnocéfalos.

Quanto aos *Naididae,* principal objeto de predatismo dos temnocéfalos, seriam legítimos comensais dos cágados, papel êste que compartilham com alguns outros tipos de invertebrados aquáticos.

Portanto, em face dos conhecimentos adquiridos sôbre a bionomia de *Temnocephala brevicornis,* relacionada com o comportamento de seus parceiros de comunidade bio-ecológica, podemos admitir como principais motivos de sua relativa especificidade para cágados:

1) — hábitos sedentários;

2) — inabilidade para obter alimento nas condições típicas de vida livre;

3) — inabilidade para defender-se de outros predadores;

4) — baixa taxa de multiplicação.

1) — Realmente, para um animal sedentário, devendo viver apoiado ou deslocar-se pouco sôbre uma superfície, será dificil encontrar melhor hospedeiro sôbre o qual exercer seu inquilinismo, que um cágado.

2) — A manifesta inabilidade para exercer o predatismo, de que depende para sua manutenção, encontra um campo de atividade muito satisfatório sôbre os cágados, que justamente oferecem abrigo e criam bôas condições alimentares, também para suas presas prediletas.

3) — Esta deficiência depende da conjugação das duas primeiras.

4) — Sua prole diminuta junta-se aos outros motivos apresentados, para tornar tão baixo seu potencial biótico, de modo a não ser capaz de sobreviver sinão nas condições muito particulares nas quais exerce seu inquilinismo.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE MORPHOLOGY, BIONOMICS AND ECOLOGY OF "TEMNOCEPHALA BREVICORNIS MONTICELLI, 1889"

*Abstract*

*1) The anterior testis were always connected to the posterior ones by means of an intertesticular duct; from each of the posterior testis a single efferent duct arises.*

*2) In regard to the internal and external seminal vesicles, the fact was observed that the latter proved to be a true seminal vesicle; on the other hand spermatozoids were never seen in the former one, and on account of its glandular structure, the "vesiculous gland" denomination was employed.*

*3) The number of testis is subject to abnormalities, specimens having been met showing: a) left-anterior atrophic, b) right-posterior, lacking, and c) three on the right side, when the left side exhibited the normal number.*

*4) The red eye-pigment, in living animals, spreads under strong light and retracts under a weaker one; this pigment disappears, when the material is fixed, and eyes can be seen only in paraffin sections.*

*5) A commissure was seen crossing the pigmented cell of the eye and connecting the two visual-rods zones.*

*6) A discussion of the hosts and their distribution is presented, the following facts being ascertained as well verified: Hydromedusa maximiliani* (MIKAN) *at Terezópolis and Angra dos Reis (Rio de Janeiro State) and Viçosa (Minas Gerais State); H. tectifera* COPE *at São Paulo (São Paulo State) — Brazil; Mesoclemmys gibba* (SCHW.) *at Brazil (after* MONTICELLI, *1899) and Platemys radiolata* (MIKAN) *at Brazil (after* MONTICELLI, *1889 and* HASWELL, *1893).*

*7) T. brevicornis survived for 71 days in small aquaria, being firstly fed with bits of a tubificid worm and then bred together with naidid worms in cultures.*

*8) The eggs layed in the aquarium hatched in 12-18 days; a young was raised for 93 days together with Naidids.*

*9) T. brevicornis is believed to exert a shelter coaction on fresh water turtles and thus behaving as an inquilin; its food coaction is mainly in relation to the oligochetae; the latter, depend directly on the turtles for shelter coaction and indirectly for food*

*coaction. Thus, this complex of relations seems to constitute a bio-ecological community: Temnocephala — Chelidae — Naididae.*

BIBLIOGRAFIA

BAER, J. G. — 1931 — Étude monographique du groupe des temnócephales. *Bull. Biol. France et Belgique.* 65, 1-57.

BRESSLAU, E. — 1927 — Ergebnisse einer zoologischen Forschungsreise in Brasilien 1913-1914 (Reisebericht). *Abhand. Seckenberg. Naturforsch. Gesellsch.* 40 (3), 179-235.

CHILTON, CH. (*) — 1899 — Note on the Parasite (Temnocephala) found on the fresh water Crayfish of New Zealand. *Trans. N. Z. Inst.* 21, 252-253.

HASWELL, W. A. — 1887 — On Temnocephala, an aberrant monogenetic Trematode. *Quart. Journ. Mic. Sc.* 28, 279-303.

HASWELL, W. A. (*) — 1893 — A Monograph of the Temnocephaleae. *Macleay Memorial Volume*, 94-158.

HASWELL, W. A. — 1924 — Critical Notes on the Temnocephaloidea. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* 49, 509-520.

MERTON, H. — 1913 — Die weiblichen Geschlechtsorgane von Temnocephala. *Zool. Anz.* 41, 413-421.

MERTON, H. — 1914 — Beiträge zur Anatomie und Histologie von Temnocephala. *Abhand. Seckenberg. Naturforsch. Gesellsch.* 35, 1-58.

MERTON, H. — 1922 — Neue Beiträge zur Anatomie von Temnocephala. *Zool. Jahrb. Anat.* 43, 539-556.

MONTICELLI, F. S. (*) — 1889 — Di una nuova specie del genere Temnocephala Blanch. ectoparassita dei cheloniani. *Napoli* 4 páginas.

MONTICELLI, F. S. — 1898 — Sulla *Temnocephala brevicornis* MONTICELLI, 1889, e sulle Temnocefale in generale. *Boll. Soc. Nat. Napoli.* 12, 72-127.

MONTICELLI, F. S. — 1904 — Il gruppo delle Temnocefale. *C. R. 6e Cong. Int. Zool. Bern.*, 402-403.

MUELLER, L. — Amphibien und Reptilien der Ausbeute Prof. BRESSLAU'S in Brasilien 1913-1914. *Abhand. Seckenberg. Naturforsch. Gesellsch.* 40 (3), 257-304.

WACKE, R. — 1905 — Beiträge zur Kenntniss der Temnocephalen. *Zool. Jahrb. Supp.* 6, 1-116.

WEBER, M. (*) — 1889 — Über Temnocephala Blanch. *Zool. Ergeb. einer Reise in Niederländisch Ost-Indien* (1), 1-29.

---

(*) Não consultado o original.

—o—

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 57

Fig. *A* — *Temnocephala brevicornis*: exemplares vivos.
Fig. *B* — *T. brevicornis:* olhos vistos a fresco.

### Estampa 58

Fig. *C* — *T. brevicornis:* canais excretores das glândulas cimentadoras, vistas a fresco.
Fig. *D* — *T. brevicornis:* gânglio cerebróide.

### Estampa 59

Fig. *E* — *T. brevicornis:* ôlho em corte frontal.
Fig. *F* — *T. brevicornis:* ôlho em corte transversal.

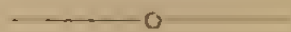
### Estampa 60

Fig. *G* — *T. brevicornis:* corte de testículo e glândulas cimentadoras.
Fig. *H* — *T. brevicornis:* corte longitudinal do cirro.

### Estampa 61

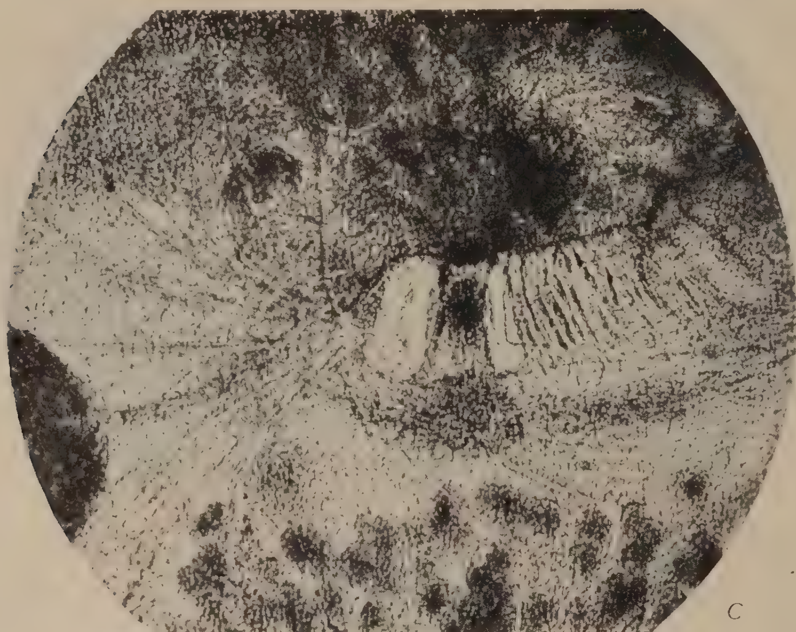
Fig. *I* — *T. brevicornis:* corte de vesícula reabsorvente, receptáculos seminais e parte do ootipo.
Fig. *J* — *T. brevicornis:* corte do ovário e início do oviducto.

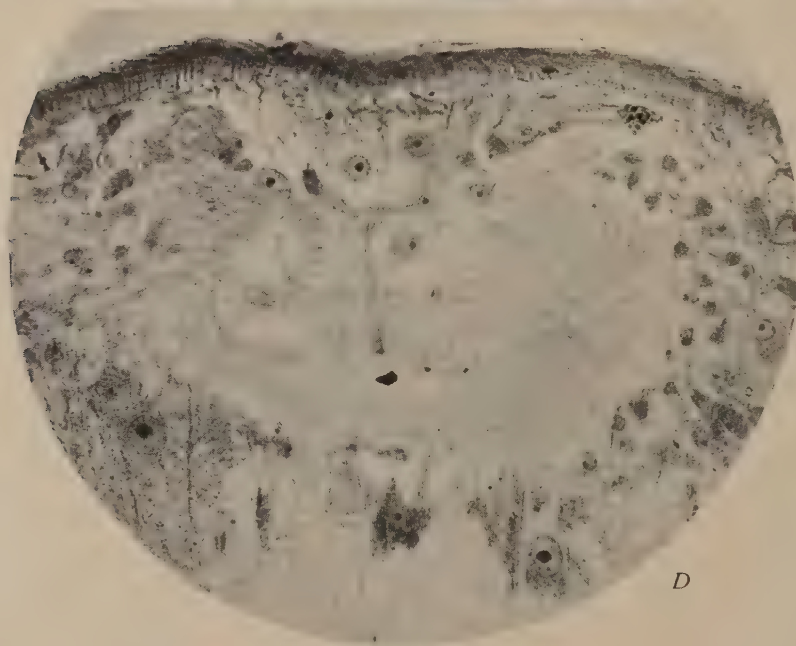
(Federman e Mazza fot.)

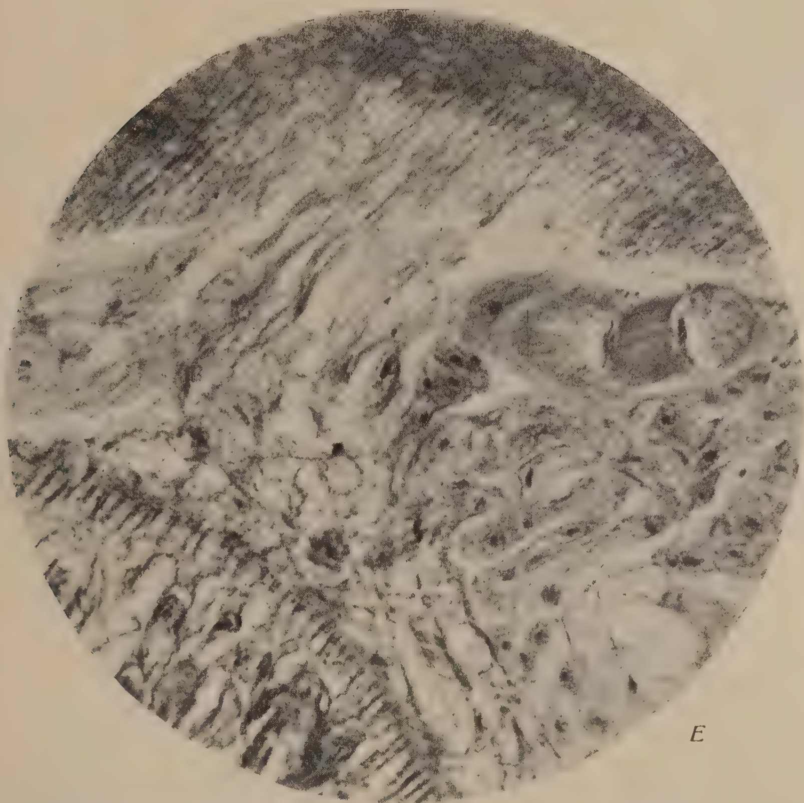


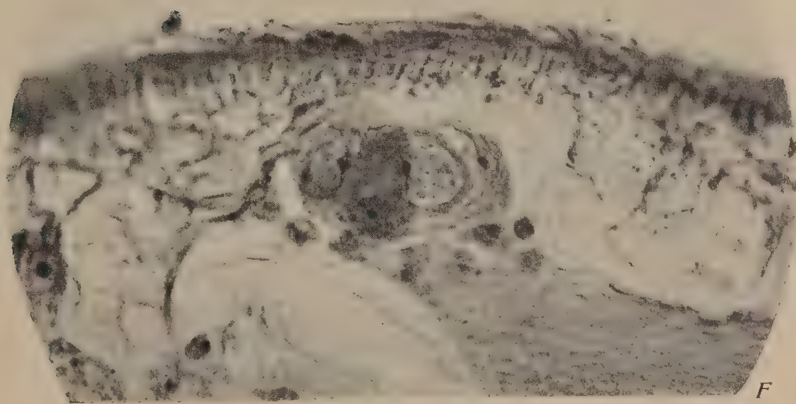

A

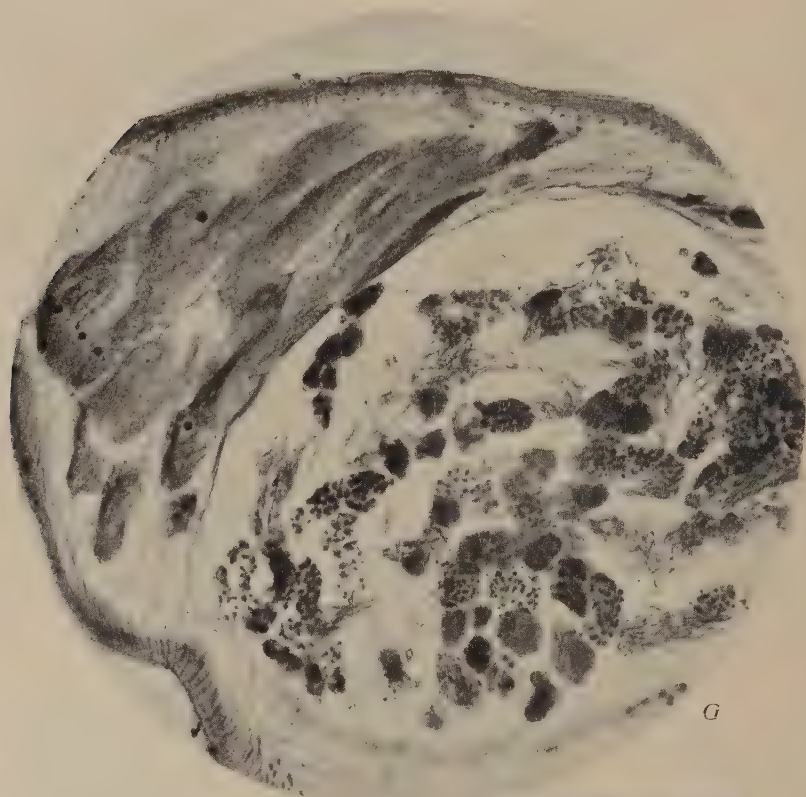

B

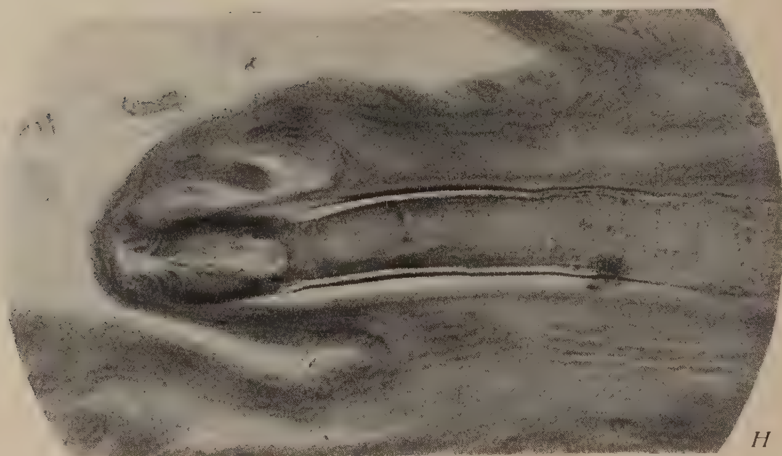

C

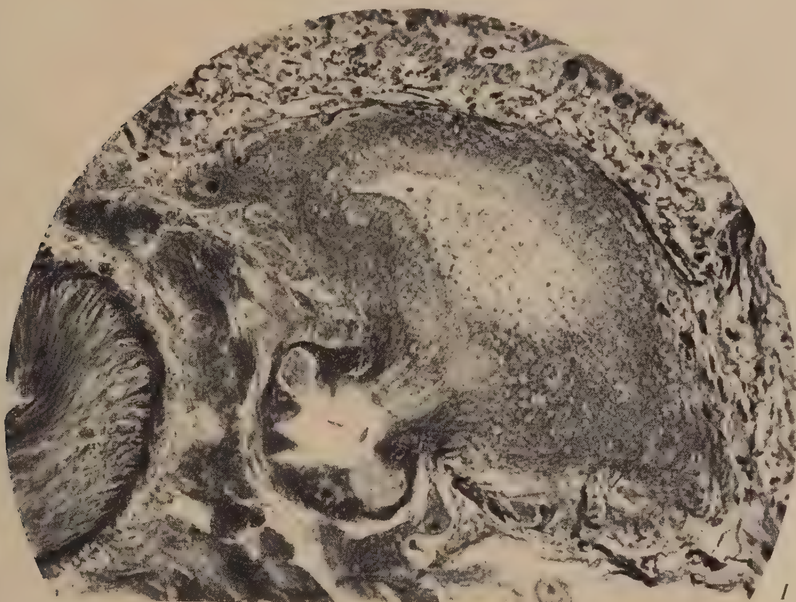

D


E

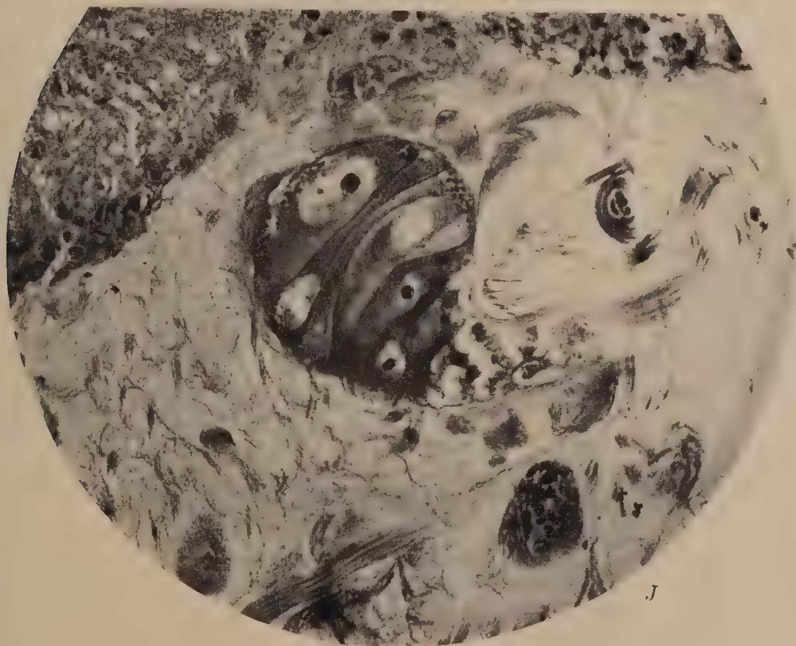

F


G


H



I



J

# TREMATOIDES BRASILEIROS DO GÊNERO "MESOCOELIUM ODHNER"

POR

C. Pereira e R. Cuocolo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 9 figuras no texto

Revendo o material de *Mesocoelium* da coleção helmintológica do Instituto Biológico, tivemos a oportunidade de esclarecer devidamente o estado atual de suas espécies no Brasil.

TRAVASSOS, 1921, descreveu a primeira espécie dêste gênero em nosso país, que denominou *M. incognitum* TRAVASSOS, 1921, com hospedeiro desconhecido, de material colhido por GOMES DE FARIA.

Em 1924, ao tratar dos trematoides intestinais de anfíbios do Brasil, refere TRAVASSOS a observação de dois tipos ocorrendo em *Bufo crucifer*, um dêles correspondente ao *M. incognitum* e outro maior, que é relacionado ao *M. sociale* (LUEHE, 1901).

A existência de variações nos dois tipos e sua associação num mesmo hospedeiro, levaram-no a considerá-los como uma só espécie e igual a *M. sociale.*

WALTON, 1938, põe em dúvida a identificação de *M. sociale* na América do Sul e aceita como bôa espécie a *M. incognitum.*

O nosso material mostrou a princípio duas espécies perfeitamente distintas do gênero *Mesocoelium;* a primeira proveniente do Estado de S. Paulo, coincidindo com as características atribuidas por TRAVASSOS ao seu *M. incognitum,* que nós redescrevemos; a segunda proveniente do Estado da Paraíba, revelou-se semelhante a *M. sociale,* porém, bem distinta da espécie de LUEHE, sendo por nós considerada nova, e descrita neste trabalho.

Ao estudar melhor o material de *M. incognitum* verificamos que nele podiamos distinguir na realidade duas espécies muito semelhantes, elevando-se dêste modo a 3 o número de espécies do gênero *Mesocoelium* no Brasil.

## *Mesocoelium incognitum* TRAVASSOS, 1921

Dicrocoeliidae de porte pequeno ou médio, corpo de contôrno elíptico, alargado, com as margens laterais quasi paralelas, ligeiramente côncavo ventralmente e fortemente convexo dorsalmente; comprimento 1,2 ± 0,049 (0,8-1,9) (*) mm.; largura máxima 0,7 ± 0,017 (0,5-0,9) mm., geralmente na zona equa-

(*) Todas as medidas de *M. incognitum* são baseadas no estudo de 35 exemplares, sendo indicada a média seguida de seu êrro standard, com as medidas extremas entre parêntesis.

torial ou ligeiramente para trás. Cutícula revestida de espinhos muito pequenos dispostos em estrias longitudinais com inclinação ântero-posterior; os espinhos são muito mais abundantes na metade anterior do corpo, em particular na parte que vai da ventosa oral ao acetábulo.

Acetábulo, musculoso, com estriação radial fina sem estrias anelares evidentes, ventral, sôbre a linha mediana, pré-equatorial, grande, pouco menor que a ventosa oral. Contôrno circular com diâmetro de 0,19 ± 0,006 (0,14-0,25) mm.

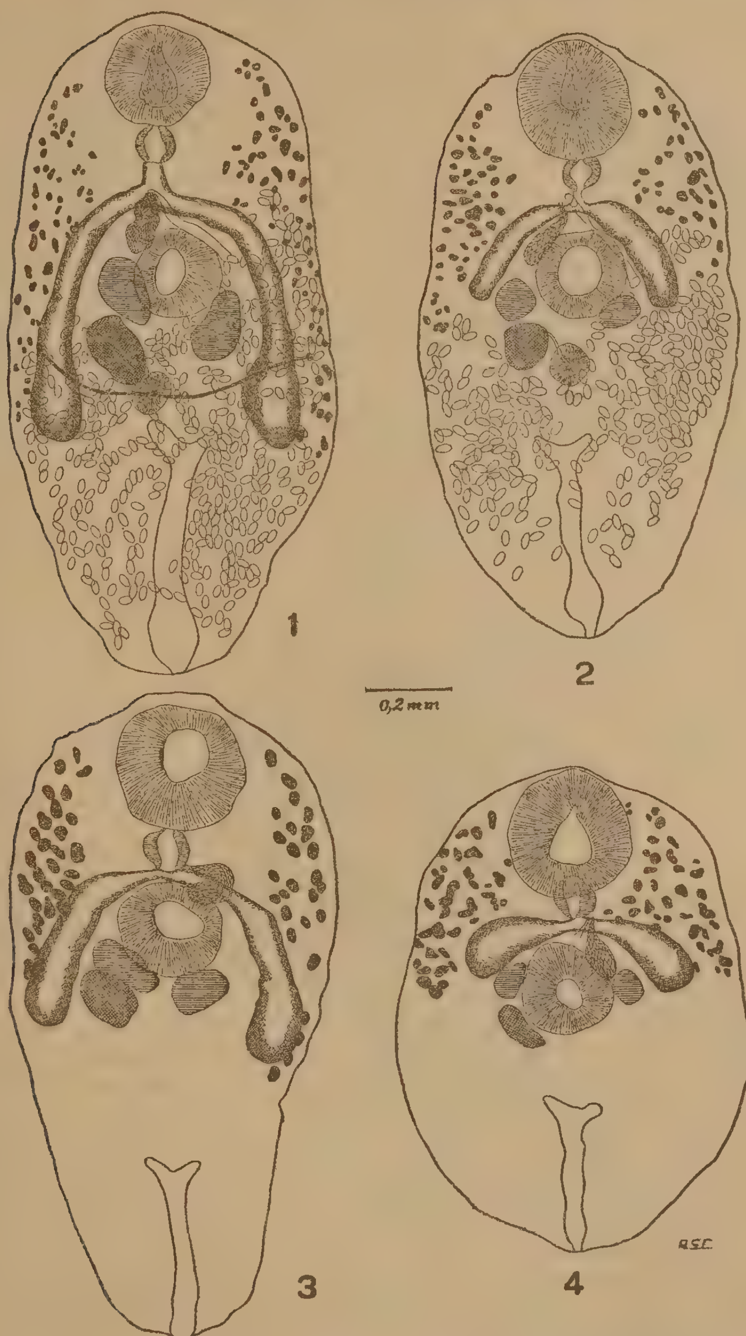
Aparelho digestivo: ventosa oral, ventral, subterminal, muscular, com densa estriação radial, não apresentando estriação anelar evidente, de contôrno circular, com bordo pouco saliente, apresentando diâmetro de 0,23 ± 0,043 (0,16-0,30) mm. Boca, em geral, em fenda dirigida sagitalmente, raramente circular. Faringe musculoso, globoide, de paredes delgadas. Forma e dimensões muito pouco variáveis em todos os exemplares; apresentando um diâmetro de 0,08 ± 0,002 (0,06-0,10) mm. Esôfago em *Y*, muito curto ou quasi nulo. Cecos intestinais extremamente variáveis, ora longos, ora muito curtos. Em alguns exemplares apresentam-se longos, atingindo cêrca de 2/3 de comprimento, em outros atingem apenas a zona equatorial, em outros mal atingem a zona acetabular, apresentando-se como duas dilatações sacciformes. Glândulas digestivas: unicelulares na região esofagiana e faringeana.

Aparelho excretor: poro excretor terminal, caudal, sôbre a linha mediana, de contôrno mais ou menos circular. Vesícula excretora em *Y*, com ramos muito curtos, atingindo a união dos 2/3 anteriores com o terço posterior do corpo.

Aparelho genital: Poro genital bifurcal ou ligeiramente prebifurcal, em geral sôbre a linha mediana ou um tanto deslocado lateralmente.

Aparelho genital ♂: Testículos de formas muito variáveis, globoides, ovoides, elipsoidais ou ás vezes muito alongados. Situação muito variavel, frequentemente intracecais, podendo, entretanto, estar em grande parte extracecalmente. Em geral o testículo direito tem o campo coincidente com o campo ovariano e está situado em nível mais anterior ao do testículo esquerdo; são de campos afastados e, em geral, com as zonas em grande parte coincidentes, encontram-se na zona acetabular; podem, contudo, deslocar-se para a zona preacetabular ou post-acetabular. As dimensões tambem variam muito, sendo em geral inferiores às do ovário. Para o testículo esquerdo encontramos um comprimento de 0,112 ± 0,004 (0,062-0,180) mm. e uma largura de 0,078 ± 0,002 (0,053-0,101) mm. Para o testículo direito o comprimento foi de 0,127 ± 0,004 (0,080-0,164) mm. e a largura de 0,083 ± 0,002 (0,049-0,115) mm. Canais eferentes curtos e muito delgados, dirigidos obliquamente para a frente e medialmente. Canal deferente tambem curto e delgado disposto sagitalmente. Bolsa do cirro: volumosa, piriforme, com ápice anterior, pré-acetabular, medindo cêrca de 0,121-0,180 mm. de comprimento e 0,041-0,057 mm. de maior largura. Encerra uma grande vesícula seminal, globosa ou elíptica, medindo 0,062-0,115 mm. de comprimento e 0,037-0,050 mm. de largura; um cirro quitinoso, delgado, curto e evaginável, e numerosas glândulas prostáticas.

Aparelho genital ♀: Ovário de forma variável, esferoidal, ovoidal, elipsoidal ou muito alongado, de situação variável, em geral intracecal, pre-equatorial com campo coincidente com o do testículo direito e zona compreendida na zona acetabular; pode, porém, encontrar-se afastado, na zona post-aceta-




*Mesocoelium incognitum.* Fig. 1 - Total. Fig. 2 - Total. Fig. 3 - Total, útero não desenhado - Fig. 4 - Total, útero não desenhado.

bular e com campo afastado do campo testicular direito. Dimensões extremamente variáveis, apresentando comprimento de 0,131 ± 0,004 (0,082-0,200) mm. e largura de 0,092 ± 0,003 (0,049-0,147) mm.. Oviducto curto e delgado, em geral em *S* itálico. Útero, enchendo a porção do corpo que fica para trás da zona acetabular. Metratermo longo, de paredes mais espessadas, iniciando-se à esquerda, ao nível do diâmetro transverso do acetábulo e indo até a bifurcação intestinal ou um pouco anteriormente. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênios, constituidos por duas séries de folículos vitelínicos, situados lateralmente nas áreas extra e pre-cecais correspondentes. Os folículos são de dimensões muito pequenas e em número extremamente variável. Apresentam um nível de origem constante, na zona da ventosa oral; contudo, o seu limite posterior é extremamente variável, em geral, acompanhando os cecos intestinais, podendo, porém, terminar muito antes ou ir até quasi à extremidade posterior do animal. Os viteloductos são longos, de direção quasi transversal, apresentando uma curvatura de concavidade anterior; próximo à linha mediana se fundem em um ducto comum. Glândula de Mehlis, grande, esferoidal ou elipsoide alongada. Receptáculo seminal, piriforme, dirigido posteriormente. Ovos, elipsoidais, de casca pouco espêssa, amarelada nos ovos novos e acastanhada nos mais velhos. Apresentam comprimento de 0,037-0,041 mm. e largura de 0,021-0,025 mm.

Hospedeiro definitivo: *Bufo marinus.*

Localização: Intestino delgado.

Procedência: Guaratinguetá. Estado de São Paulo. Brasil.

Diagnose diferencial: *M. incognitum* diferencia-se de todas as outras espécies do gênero, providas de espinhos na cutícula, por ter seus folículos vitelogênicos iniciando-se bem anteriormente, ao nivel ou mesmo adiante do maior diâmetro da ventosa oral.

## *Mesocoelium waltoni*, n. sp.

Dicrocoeliidae (*) de porte médio; corpo de contôrno elíptico alongado, com as margens regularmente convexas; de comprimento de 1,15 a 1,75 mm. e apresentando maior largura de 0,49 a 0,70 mm. na zona equatorial. Cutícula lisa, não apresentando pregas nem espinhos.

Acetábulo musculoso, com estriação radial densa e fina, sem estrias anelares evidentes, ventral, sôbre a linha mediana, compreendido no segundo quarto do corpo, pequeno, menor que a ventosa oral, de contôrno circular, com bordo pouco saliente, apresentando um diâmetro de 0,14 a 0,20 mm.

Aparelho digestivo: ventosa oral muscular, com estriação radial fina e abundante e estriação anelar não evidente; ventral, subterminal, de contôrno circular, apresentando diâmetro de 0,20 a 0,26 mm. Boca grande, em geral de contôrno circular ou subcircular. Faringe musculoso, de paredes pouco espêssas, globoide, com diâmetro de 0,07 - 0,08 mm. Esôfago em *Y*, de calibre regular, longo ou muito longo. Cecos intestinais de paredes delgadas e luz variável, em geral longos, atingindo ou passando a zona ovariana, com comprimento de 0,50 a 0,72 mm. Glândulas digestivas unicelulares, nas regiões esofagiana e faringeana.

(*) Descrição baseada em 4 exemplares que estavam associados a *M. incognitum.*

Aparelho excretor: poro excretor terminal, caudal, sôbre a linha mediana, de contôrno mais ou menos circular. Vesícula excretora

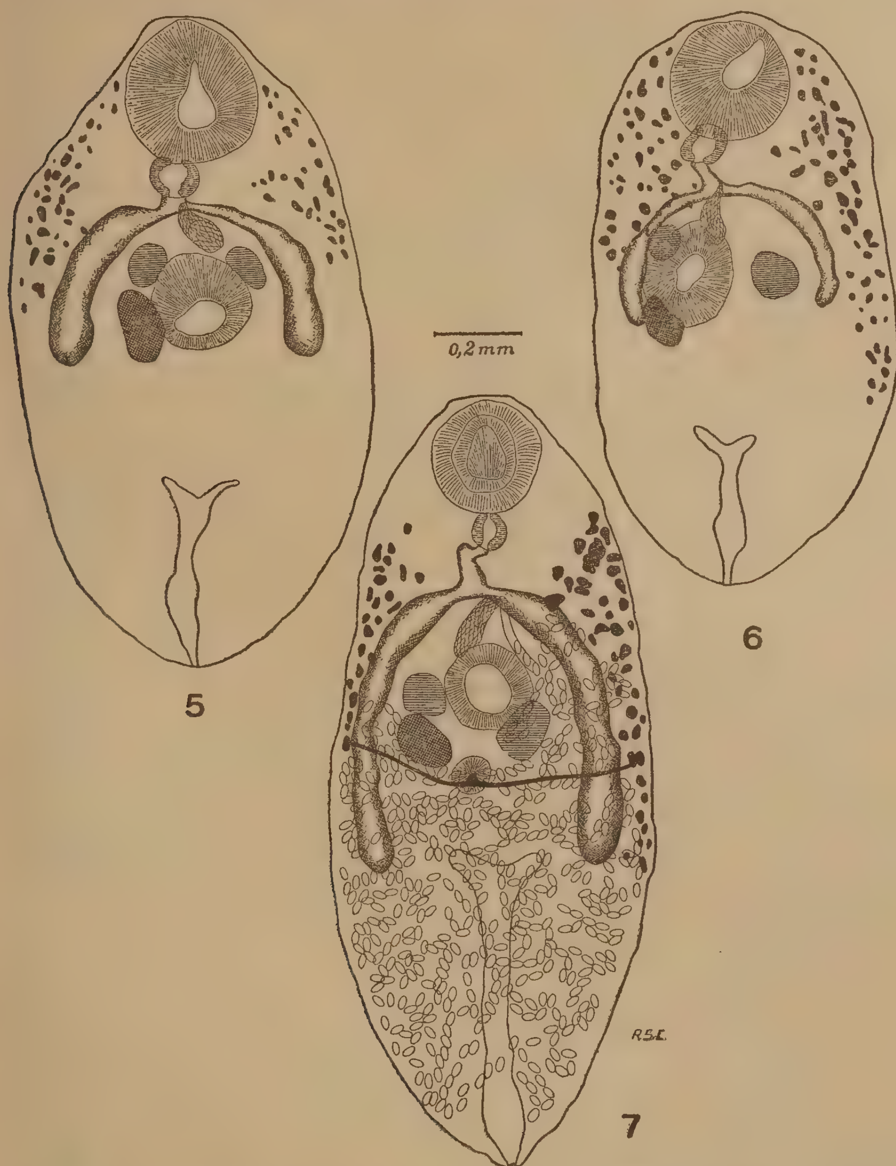



Fig. 5 — *Mesocoelium incognitum*, total, útero não desenhado. Fig. 6 — *M. incognitum*, total, útero não desenhado. Fig. 7 — *M. waltoni* n. sp., total.

muito longa, correspondendo a mais de um terço do comprimento total do corpo, calibrosa, em forma de *Y* com ramos oblíquos muito curtos.

Aparelho genital: poro genital bifurcal, em geral um tanto deslocado lateralmente.

Aparelho genital ♂: Testículos globoides, ovoides ou elipsoidais; situados na área intracecal, com campos afastados e zonas parcialmente coincidentes. O testículo direito tem o campo coincidente com o campo ovariano e a zona compreendida na zona acetabular. O testículo esquerdo está em nível mais posterior, com a zona fora ou somente em parte na zona acetabular e coincidente com a zona ovariana. Para o testículo esquerdo o comprimento variou de 0,098 a 0,147 mm e a largura de 0,053 a 0,098 mm; para o testículo direito a variação foi de 0,098 a 0,147 mm para o comprimento e 0,082 a 0,095 mm para a largura. Canais eferentes delgados, com direção inclinada para frente e medialmente. Canal deferente curto e delgado, com direção mais ou menos sagital. Bolsa do cirro volumosa, piriforme, com polo obtuso voltado posteriormente, apresentando comprimento de 0,164 mm e maior largura de 0,049 - 0,057 mm; tendo no interior uma grande vesícula seminal, globosa ou ovoide com 0,082 mm de comprimento e 0,041 - 0,049 mm de largura; cirro relativamente curto, delgado, quitinoso, evaginável, e numerosas glândulas prostáticas.

Aparelho genital ♀ : ovário globoso ou ovoide, compreendido na área intracecal, à direita da linha mediana, na zona post-acetabular, com campo coincidente com o campo testicular direito e a zona na maior parte coincidente com a zona testicular esquerda. Mede 0,106 - 0,131 mm de comprimento e 0,078 - 0,123 mm de largura. Oviducto curto, delgado, dirigido para trás e medialmente. Útero enchendo a porção post-acetabular do corpo. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênio constituido por duas séries de folículos, dispostos lateralmente, nas áreas pre e extra-cecais correspondentes. Os folículos são mais volumosos e menos numerosos que em *M. incognitum* TRAVASSOS, 1921. Começam ao nível da zona faringeana e se extendem ordinariamente até o limite posterior dos cecos, podendo, entretanto, não o atingir, ou ultrapassá-lo. Viteloductos em direção quasi transversal, unidos em *Y* na linha mediana. Glândula de Mehlis globosa ou alongada, muito próxima do ovário, volumosa. Receptáculo seminal piriforme ou elipsoide, dirigido posteriormente. Ovos elipsoides, de casca pouco espêssa, amarelada nos ovos novos, acastanhada nos mais velhos; medem 0,37 - 0,041 mm de comprimento e 0,021 - 0,025 mm de largura.

Esta espécie é dedicada a A. G. WALTON.

Hospedeiro definitivo: *Bufo marinus.*

Localização: Intestino delgado.

Procedência: Guaratinguetá. Estado de São Paulo. Brasil.

Diagnose diferencial: *M. waltoni,* por não ter espinhos, aproxima-se de *M. megaloon* JOHNSTON, 1912 e de *M. carli* ANDRÉ, 1915; é facilmente distinguivel da primeira espécie não só pela relação entre o tamanho das ventosas, como por outros caracteres, e da segunda tambem pelo tamanho relativo das ventosas, tamanho e distribuição dos folículos vitelogênicos.

## *Mesocoelium travassosi*, n. sp.

*Dicroceliidae* (*) de porte grande; corpo de contôrno elíptico. Comprimento de 2,67 mm a 3,11 mm, maior largura de 1,25 a 1,36 mm, mais ou menos na união do terço anterior com os 2/3 posteriores. Cutícula sem pregas, mas apresentando pequenos espinhos na metade anterior do corpo, indo até cêrca do limite posterior da vitelária.

Acetábulo musculoso, com estriação radial fina, sem estriação anelar evidente, ventral, sôbre a linha mediana, pequeno, situado na metade anterior do corpo, dividindo-o na razão de 1:3, menor que a ventosa oral, com a qual guarda a relação de 1,5 - 1,57. De contôrno circular e bordo pouco saliente. Diâmetro externo de 0,20 a 0,24 mm e diâmetro interno de 0,10 - 0,13 mm. A distância que vai do seu bordo anterior ao bordo posterior da ventosa oral varia de 0,30 a 0,33 mm.

Aparelho digestivo: ventosa oral ventral, subterminal; de contôrno circular ou subcircular; musculosa, com estriação radial fina e anelar não evidente. Com diâmetro externo variando de 0,30 a 0,32 mm e diâmetro interno de 0,19 a 0,21 mm. Boca fendiforme, de maior eixo medindo em média 0,06 mm e dirigido sagitalmente. Faringe pequeno, globoide, com diâmetro de 0,12 a 0,14 mm e de paredes delgadas. Esôfago em *T*, com o ramo vertical muito curto, quasi nulo. Cecos intestinais curtos, indo pouco além da metade do corpo; de comprimento de 1,1 a 1,3 mm. Paredes delgadas e luz variável, tendo em média um diâmetro de 0,10 a 0,16 mm. Glândulas digestivas unicelulares, abundantes nas regiões faringeana e esofagiana.

Aparelho excretor: poro excretor terminal, sôbre a linha mediana, de contôrno circular com diâmetro de cerca de 0,025 mm. Vesícula excretora em *Y* com ramo vertical muito longo e ramos oblíquos curtos, apresentando um diâmetro de 0,06 a 0,10 mm.

Aparelho genital: com exceção do útero, todos os seus componentes estão colocados na metade anterior do corpo. O poro genital é mediano e ventral, ligeiramente prebifurcal ou mesmo faringeano.

Aparelho genital ♂ : Testículos globoides ou ovoides, com maior eixo ântero-posterior, situados na área intracecal, um à direita e outro à esquerda, na zona acetabular, de campos afastados e zonas em grande parte coincidentes; o campo do testículo direito é em grande parte coincidente com o campo ovariano. Ambos pré-equatoriais e pré-ovarianos, podendo o testículo esquerdo ter sua zona em parte coincidente com a zona ovariana. O testículo esquerdo é sempre mais volumoso que o direito. Em nossos exemplares tivemos para o testículo esquerdo: 0,28 - 0,30 mm de comprimento e 0,18 - 0,23 mm de largura e para o direito: 0,25 - 0,26 mm de comprimento e 0,18 - 0,23 mm de largura. Canais eferentes curtos, dirigidos transversalmente, unindo-se na linha mediana. Canal deferente curto, sagital. Bolsa do cirro volumosa, pré-equatorial, piriforme, com polo obtuso voltado posteriormente, medindo 0,20 mm de comprimento e 0,10 - 0,12 mm de maior largura. Contém na sua porção caudal uma vesícula seminal volumosa, de forma elipsoidal, com comprimento de 0,12 - 0,15 mm e largura de 0,10 - 0,11 mm.

(*) Descrição baseada em 3 exemplares.

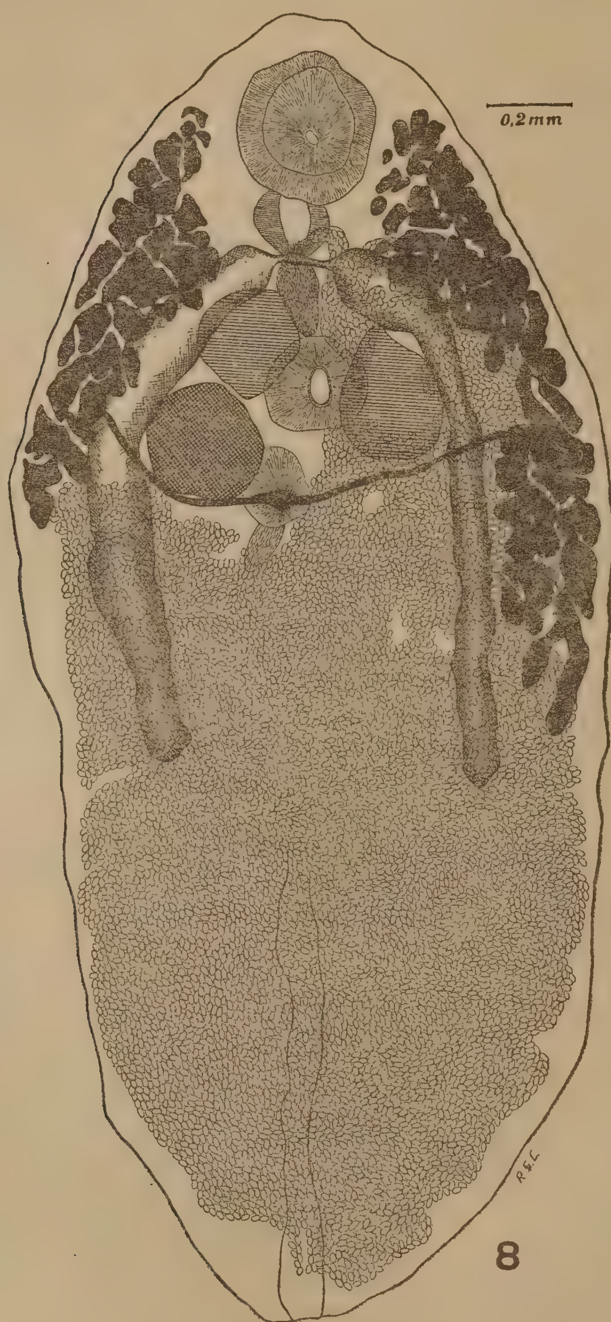



Fig. 8 — *Mesocoelium travassosi* n. sp., total.

A p a r e l h o g e n i t a l ♀ : O v á r i o esférico ou ligeiramente ovoide, pré-equatorial, post-acetabular, intracecal, à direita da linha mediana; com campo em grande parte coincidente com o campo testicular direito; às vezes coincidente tambem, em parte, com o campo acetabular; sua zona é parcialmente coincidente com as zonas acetabular e testicular esquerda. E' volumoso, em geral, maior que o testículo direito e menor que o testículo esquerdo, medindo 0,25 - 0,29 mm de comprimento e 0,21 - 0,26 mm de largura. Ú t e r o, enchendo toda a porção do

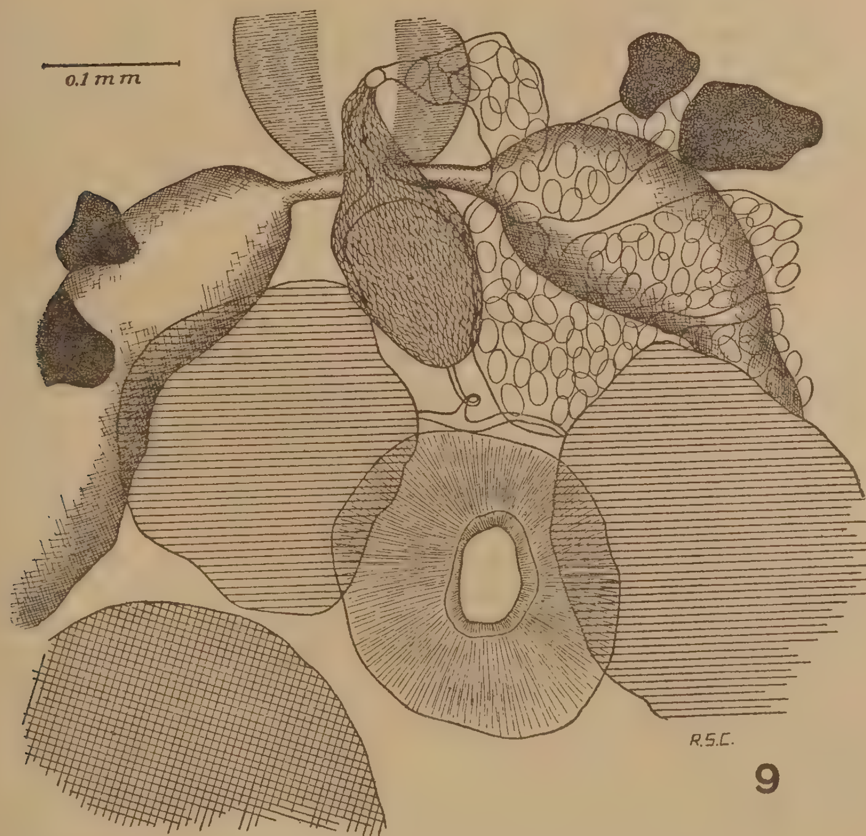



Fig. 9 — *M. travassosi* n. sp., detalhe da bolsa do cirro.

corpo que fica para trás do ovário. A n e x o s a o a p a r e l h o g e n i t a l ♀ : V i t e l o g ê n i o s constituidos por duas séries de folículos vitelínicos, volumosos e de contôrno irregular, situados lateralmente, ocupando as áreas extra e prececais correspondentes; iniciando-se na altura da ventosa oral vão até cerca do limite posterior dos cecos intestinais. Os viteloductos têm uma direção quasi transversal, o esquerdo, contudo, apresenta uma curva que pela concavidade, abraça a face posterior do ovário; na altura da linha mediana unem-se em *Y* em um viteloducto único. G l â n d u l a d e M e h l i s volumosa, próxima do ovário, de contôrno circular, tendo cêrca de 0,12 mm de diâmetro. R e c e p t á-

culo seminal grande, mais ou menos piriforme, com o polo obtuso dirigido posteriormente. Ovos elipsoidais, de casca fina e corada de amarelo nos ovos novos e de castanho escuro nos mais velhos; têm 0,033 - 0,037 mm de comprimento e 0,025 - 0,026 mm de largura.

Esta espécie é dedicada a L. TRAVASSOS.

Hospedeiro definitivo: *Bufo* sp.

Localização: Intestino delgado.

Procedência: Areia. Estado da Paraíba. Brasil.

Diagnose diferencial — *M. travassosi* tambem se diferencia das outras espécies do gênero pelo início anterior dos folículos vitelogênicos, no que concorda com *M. incognitum;* distingue-se dêste, entretanto, não só pelo maior tamanho de seus folículos vitelogênicos como pelo tamanho relativo das ventosas, e pelo maior porte.

## CONCEITO DE ESPÉCIE NO GÊNERO "MESOCOELIUM"

Procurando identificar as espécies dêste gênero que ocorrem no Brasil, ao estudar o abundante material de *M. incognitum* TRAV., 1921, ficamos profundamente impressionados com a grande variabilidade dentro dessa espécie. Os caracteres específicos então empregados, principalmente o comprimento relativo dos cecos, o tamanho e a posição relativas das gonadas, bem como sua situação relativamente ao acetábulo, estavam sujeitas a tais variações, evidentemente de caracter não específico, que nos levaram a desprezá-las inteiramente como critério de especificação dentro do gênero.

Realmente, escolhendo 35 exemplares de *M. incognitum,* ao acaso, e determinando o coeficiente de variação das principais variaveis contínuas tidas como características das espécies de *Mesocoelium,* encontramos os seguintes valores: comprimento do corpo: V = 24,1; largura: V = 14,28; diâmetro do acetábulo: V = 18,94; diâmetro da ventosa oral: V = 18,69; diâmetro do faringe: V = 16,25; maior diâmetro do testículo esquerdo: V = 21,42; idem do testículo direito: V = 20,47; idem do ovário: V = 20,61, coeficientes todos êstes suficientemente elevados para, considerando-se a relativa homogeneidade do material estudado quanto à idade, significar um grande âmbito de flutuação para cada uma das variáveis consideradas isoladamente.

Tivemos a oportunidade de verificar que os caracteres realmente importantes são: presença ou ausência de espinhos, tamanho relativo das ventosas, situação relativa do acetábulo, ponto de início dos vitelogênios, tamanho dos folículos vitelogênicos e, muito cautelosamente, o comprimento do esôfago e a relação dos dois maiores diâmetros do corpo.

Outro fato que muito nos impressionou foi a extrema homogeneidade encontrada dentro das espécies do gênero, não só no que diz

respeito ás dimensões tanto absolutas como relativas dos detalhes de sua organização, como ao plano geral de construção, que é essencialmente o mesmo em todas as espécies até agora conhecidas do gênero *Mesocoelium*.

Êste fato permite-nos a análise das espécies conhecidas de *Mesocoelium* segundo o critério que estabelecemos para o estudo de *M. incognitum*, sendo possivel supor para as outras espécies do gênero, valores sensivelmente da mesma ordem para os coeficientes de variação de suas variáveis, tomando como têrmo de comparação os determinados para *M. incognitum*.

A espécie-tipo do gênero, *M. sociale* (LUEHE, 1901), descrita de material indú, parasita de *Bufo melanostictus*, está bem caracterizada, não dando margem a dúvidas; posteriormente apareceu *M. meggitti* BHAELRAO, 1927, de *Mabuia dissimilis*, mais afim de *mesembrinum*, porém com vitelogênios mais volumosos e esôfago mais longo, que em *sociale*.

Em 1912 surgiram na Austrália tres espécies do mesmo gênero: *M. mesembrinum* JOHNSTON, 1912 de *Hyla coerulea*, *M. oligoon* JOHNSTON, 1912 de *Hyla citropus*, e *M. megaloon* JOHNSTON 1912, de *Hyla ewingii*, às quais se juntou pouco depois uma quarta espécie, *M. microon* NICOLL, 1914, de *Hyla coerulea*, *H. gracilenta* e *Tiliqua scincoides*, aparentemente sem o conhecimento do trabalho de JOHNSTON, 1912.

*M. mesembrinum* distingue-se de *sociale* por ter esôfago longo e acetábulo menor; *oligoon* é um exemplar pouco desenvolvido de *mesembrinum* e *microon* tambem é idêntico a *mesembrinum*.

No Brasil foi descrito *M. incognitum* TRAVASSOS, 1921, de hospedeiro desconhecido, que posteriormente TRAVASSOS, 1924, reestutou em material de *Bufo crucifer*, concluindo por sua possivel identidade com *M. sociale*, o que já verificamos não ser possivel pela diagnose diferencial de *M. incognitum*. Neste trabalho juntamos mais duas espécies de material brasileiro: *waltoni* e *travassosi*, ambas em amfíbios do gênero *Bufo*, a primeira desprovida de espinhos e relacionada com *megaloon*, da qual se distingue principalmente pelo maior tamanho do acetábulo, e a segunda mais próxima de *incognitum*, com espinhos, porém com acetábulo menor e folículos vitelogênicos bem maiores.

Na Africa foi descrito *M. carli* ANDRÉ, 1915, de *Cinixys belliana*, desprovido de espinhos, diferindo de *megaloon* pelo tamanho relativo das ventosas e de *waltoni* pelo tamanho e comportamento dos vitelogênicos. Outra espécie africana, *M. monadi* DOLLFUS, 1929, de *Chamaeleon gracilis*, aproxima-se de *M. brevicaecum*, do qual pode ser distinguida pela presença de um prefaringe.

As espécies japonesas do gênero apareceram em número de seis, a saber: *M. brevicaecum* GOTO e OZAKI, 1929, de *Bufo vulgaris formosus*, *M. elongatum* GOTO e OZAKI, 1929, de *Diemyctylus pyrrhogaster*, *M. lanceatum* GOTO e OZAKI, 1929 de *Tylototriton andersoni*, *M. pearsei* GOTO e OZAKI, 1930 de *Pseudosalamandra stejnegeri*, *M. japonicum* GOTO e OZAKI, 1930, de *Polypedates buergeri* e de *Pseudosalamandra stejnegeri* e *M. ovatum* GOTO e OZAKI, 1930 de *Rana rugosa*.

Si levarmos em consideração o tamanho relativo do acetábulo, *brevicaecum* terá maiores afinidades com *sociale* e *pearsei*, afastando-se de ambas por ter o acetábulo colocado menos anteriormente; por outro lado, *elongatum* e *ovatum* pareceram-nos indestinguiveis de *brevicaecum*. *M. lanceatum* constitue uma espécie bem definida por seu acetábulo relativamente pequeno. *M. pearsei* afasta-se de *sociale* por ter o esôfago longo, e de *brevicaecum* por ter o acetábulo situado mais anteriormente; *japonicum* pareceu-nos indistinguivel de *pearsei*.

Em Ceilão foram descritas *M. burti* FERNANDO 1933, de *Racophorus maculatus* e *M. marrsi* FERNANDO, 1933, de *Racophorus eques*; *burti* é afim de *sociale*, da qual parece distinta pelo maior tamanho dos folículos vitelogênicos, e de *meggitti*, possuidora de acetábulo menor; *marrsi* tem todas as características de exemplar ainda novo de *burti*, devendo a assinalada inexistência de espinhos cuticulares, provavelmente correr por conta de uma possivel retração dêles, o que ocorre frequentemente em espécies dêste gênero.

Segundo o critério adotado, procuramos estabelecer a seguinte chave para a determinação das espécies que nos pareceram válidas no gênero *Mesocoelium*:

1 — Cuticula não revestida de espinhos . . . . . . . . 2
1' — Cuticula revestida de pequenos espinhos . . . . 3
2 (1) — Relação $\frac{\text{ventosa oral}}{\text{acetábulo}}$ maior que $\frac{2}{1}$ . . . . *M. megaloon*
2' (1) — Relação $\frac{\text{ventosa oral}}{\text{acetábulo}}$ menor que $\frac{2}{1}$ . . . . . . . . 4
3 (1') — Vitelogênios iniciando-se à altura do maior eixo da ventosa oral . . . . . . . . . . . . . . . . 5
3' (1') — Vitelogênios iniciando-se à altura do esôfago . . . 6
4 (2') — Folículos vitelogênicos bem menores que os ovos *M. carli*
4' (2') — Folículos vitelogênicos da mesma ordem de tamanho que os ovos . . . . . . . . . . . . . . . *M. waltoni*
5 (3) — Folículos vitelogênicos da mesma ordem de tamanho que os ovos . . . . . . . . . . . . . . *M. incognitum*

5'(3) — Folículos vitelogênicos muito maiores que os ovos . . . *M. travassosi*

6 (3') — Relação $\frac{\text{ventosa oral}}{\text{acetábulo}}$ maior que $\frac{1,5}{1}$ . . . . *M. lanceatum*

6'(3') — Relação $\frac{\text{ventosa oral}}{\text{acetábulo}}$ igual a $\frac{1,5}{1}$ . . . . . . . . . 7

6"(3') — Relação $\frac{\text{ventosa oral}}{\text{acetábulo}}$ menor que $\frac{1,5}{1}$ . . . . . . . . . 8

7 (6') — Folículos vitelogênicos bem maiores que os ovos . . . *M. meggitti*

7'(6') — Folículos vitelogênicos da mesma ordem de tamanho que os ovos (=*oligoon*, =*microon*) . . . *M. mesembrinum*

8 (6") — Relação $\frac{\text{limite post. acet. até extr. post.}}{\text{limite post. acet. até ext. ant.}}$ maior que $\frac{2}{1}$ . . . 9

8'(6") — Relação $\frac{\text{limite post. acet. até extr. post.}}{\text{limite post. acet. até ext. ant.}}$ menor que $\frac{2}{1}$ . . . 10

9 (8) — Esôfago longo . . . (=*japonicum*) . . *M. pearsei*

9'(8) — Esôfago curto . . . . . . . . . . . . . . . . . 11

10 (8') — Prefaringe presente . . . . . . . . . *M. monadi*

10'(8') — Prefaringe ausente (=*elongatum*=*ovatum*) . . . . . *M. brevicaecum*

11 (9') — Folículos vitelogênicos maiores que os ovos (=*marrsi*) . . *M. burti*

11'(9') — Folículos vitelogênicos da mesma ordem de tamanho que os ovos . . . . . . . . . . . . . . . *M. sociale*

BRAZILIAN TREMATODES OF THE GENUS "MESOCOELIUM ODHNER"

*Abstract*

*In the present paper redescription of M. incognitum* TRAV., *1921 and descriptions of M. waltoni n. sp. and M. travassosi n. sp., from Brazilian toads, are given.*

*A critical revision is made of the specific characters adopted in the study of the genus. The data were obtained from a careful analysis of M. incognitum, the variation coefficients of which were determined for its variables more usually employed in the systematic of the group. The very high values thus obtained and the great homogeneity exhibited by the species, have lead the AA. to employ a criterion that appeared better based than those heretofore used. Thus, M. oligoon* JOHNSTON, *1912 and M. microon* NICOLL, *1914, were found to be undistinguishable from M. mesembrinum* JOHNSTON, *1912; M. elongatum* GOTO *et* OZAKI, *1929 and M. ovatum* GOTO *et* OZAKI, *1930, seemed the same as M. brevicaecum* GOTO *et* OZAKI, *1929; M. japonicum* GOTO *et* OZAKI, *1930*

*is identic with M. p e a r s e i* GOTO *et* OZAKI, *1930; M. m a r r s i* FERNANDO, *1933 seems a young M. b u r t i* FERNANDO, *1933; M. s o c i a l e* (LUEHE, *1901*) *is stated as absent from Brazil.*

*A key is given for the apparently valid species.*

## BIBLIOGRAFIA

ANDRÉ, E. — 1915 — Mesocoelium carli n. sp. trematode parasite d'une tortue africaine. *Rev. Suisse Zool.* **33**, 91-93.

BHALERAO, G. D. — 1927 — A new species of trematode from Mabuia dissimilis. *Ann. Mag. Nat. Hist. Ser.* 9. **20**, 611-615.

DOLLFUS, R. Ph. — 1929 — Helmintha I. Trematoda et Acantocephala. *Faune des Colonies Françaises* **3** (2), 73-114.

FERNANDO, W. — 1933 — Contribuitions to Ceylon helminthology, Mesocoelium burti, sp. nov., Mesocoelium marrsi, sp. nov. and Haplorchis paersoni sp. nov.. *Ceylon Journ. Sci., Sec. B. Zool. Geol. Spolia Zeylanica.* **18** (1), 9-18.

GOTO, S. & OZAKI, Y. — Brief Notes on new Trematodes. I. *Jap. Journ. Zool.* **2**, 213-217.

GOTO, S. & OZAKI, Y. — 1930 — Brief Notes on new Trematodes III. *Jap. Journ. Zool.* **3**, (1), 73-82.

JOHNSTON, S. J. — 1912 — On some trematodes Parasites of Australian Frogs. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* **37**, 285-362.

LUEHE, M. F. — 1901 — Zwei neue Distomen aus indischen Anuren. *Centralb. Bakteriol., Parasitenk., u. Infek.*, Jena. I. Abt., **30**, 171-173.

NICOLL, WM. — 1924 — The trematodes parasites of North Queensland. I. *Parasitol*, **6**, 333-350.

ODHNER, T. — 1910 — Nordostafrikanische Trematoden, grossenteils vom Weissen Nile. I. Fascioliden, Results of the *Swedish Zoological Expedition* to Egypt and the White Nile. 1901 n.º 23 A, 22-76.

SEWELL, R. B. S. (*) — 1920 — On Mesocoelium sociale (LUEHE) *Rec. Ind. Mus.* **19**.

TRAVASSOS, L. — 1921 — Trematodeos novos, III. *Braz. Med.* 35 (1), 221-222.

TRAVASSOS, L. — 1924 — Contribuições para o conhecimento dos helminthos dos batrachios do Brasil. I. Trematodeos intestinais. *Sci. Med.* 11, 1-7.

WALTON, A. C. — 1938 — The Trematodes as Parasites of Amphibia. Contr. From the Biol. Laborat., of Knox College n.os 61, 62, 63. (Mimiografado).

(*) Não consultado o original.

—o—

# TREMATOIDES VESICAIS DE ANFÍBIOS DO NORDESTE BRASILEIRO

POR

C. Pereira e R. Cuocolo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

Estudando o material helmintológico colhido por um dos autores (C. PEREIRA) em 1933, quando comissionado na Comissão Técnica de Piscicultura do Nordeste, então dirigida pelo saudoso Dr. RODOLPHO VON IHERING, destacámos para a presente nota os resultados relativos ao exame dos trematoides vesicais de anfíbios.

Foram praticadas 94 necrópsias de anuros, das quais 79,79% foram positivas para helmintos. Das autópsias positivas 25,33% foram positivas para trematoides, sendo a maioria (78,94%) de trematoides vesicais. Dos trematoides vesicais 93,33% foram constituidos por *Gorgoderina parvicava* TRAVASSOS, 1920, e em uma única necrópsia (6,67%) encontramos uma gorgoderina de vitelinos lobados e que consideramos como nova espécie, cuja descrição se segue.

## Gênero *Gorgoderina* LOOSS

Nêste gênero nota-se a tendência para a individualização de dois grupos de espécies, relativamente à conformação dos vitelogênios.

Um dos grupos filia-se à espécie tipo do gênero, *G. vitelliloba* (OLSSON, 1876) LOOSS, 1902, com vitelinos apresentando ácinos perfeitamente livres.

Outro grupo, filia-se ao tipo de *G. simplex* (LOOSS, 1899) LOOSS, 1902, com vitelinos compactos, ou superficialmente lobados.

Parece-nos, portanto, que de tal ponto de vista, o gênero *Gorgoderina* comporta uma fragmentação em dois subgêneros bem típicos:

### *Gorgoderina (Gorgoderina)* n. subgen.

Espécie tipo: *G. (G.) vitelliloba* (OLSSON, 1876) LOOSS, 1902, em *Bombina bombina, Bufo bufo, Rana arvalis, R. a. isaitchkowi, R. esculenta, R. macrocnemis* e *R. temporaria.* Europa.

Outras espécies:

*G. (G.) translucida* (STAFFORD, 1902) STAFFORD, 1905, em *Bufo americanus* e *Rana pipiens.* Canadá.

*G. (G.) diaster* (LUTZ, 1925) LUTZ, 1928, "species inquirendae", em anfíbios anuros de Maracai (Venezuela).

*G. (G.) multilobata* Ingles & Langston, 1933, em *Rana aurora, R. boylii,* e *R. pretiosa.* U. S. A.

*G. (G.) rochalimai,* n. sp., em *Bufo* sp. Brasil.

*Gorgoderina (Neogorgoderina)* n. subgen.

Espécie tipo: *G. (N.) simplex* (Looss, 1899) Looss, 1902 em *Bufo americanus, Rana catesbiana, R. clamitans* e *R. pipiens.* Canadá.

Outras espécies.

As dôze restantes não mencionadas no subgênero *Gorgoderina.*

*Gorgoderina (Gorgoderina) rochalimai,* n. sp.

*Gorgoderinae* (*) de porte grande. Corpo alongado, subfusiforme, com extremidades afiladas. Cutícula lisa, sem espinhos nem pregas. Coloração acastanhada escura. Comprimento de 16,6 mm., apresentando maior largura na união do terço anterior com os 2/3 posteriores, correspondentes à zona ovariana e igual a 2,7 mm.

Acetábulo — Ventral, sôbre a linha mediana, muito grande; situado bem anteriormente, de modo a dividir o corpo em duas porções na razão de 1:7. Bem maior que a ventosa oral, com a qual guarda a relação de 1,7. De contôrno circular, com bordo fazendo pequena saliência na superfície ventral; fundo em calota esférica, tomando o aspeto de uma taça muito larga e muito raza. Pé de implantação de contôrno elíptico de maior eixo transverso. Apresenta um diâmetro externo de 1,4 mm. e um diâmetro interno de 0,9 mm. Órgão musculoso, com estriação radial muito abundante e muito fina, sem estriação anelar evidente. A distância que separa o seu bordo anterior do bordo posterior da ventosa oral é de 0,7 mm.

Aparelho digestivo — Ventosa oral: ventral subterminal, de contôrno subcircular, com ligeira predominância do eixo sagital (= 0,87 mm.) sôbre o eixo transverso (= 0,81 mm.). Bordo saliente e obtuso, mais largo caudalmente (= 0,16 mm.) do que anteriormente (= 1 mm.). Órgão musculoso, com estriação radial muito fina e abundante, sem estriação anelar evidente. Boca, grande, em forma de fenda elíptica, com maior eixo de 0,32 mm., disposto transversalmente, subterminal, ventral, muito próxima do bordo anterior da ventosa oral. Cavidade bucal, ampla, caliciforme, de 0,49 mm. de comprimento e 0,54 mm. de maior largura. Faringe, ausente. Esôfago, delgado, de secção cilíndrica, com 0,08 mm. de diâmetro. Em forma de *T*, tendo o ramo vertical longo ligeiramente sinuoso, de 0,4 mm. de comprimento, e o ramo transverso um pouco mais curto, de 0,03 mm. de comprimento. Cecos intestinais, muito longos, terminando em fundo cego, próximo à extremidade caudal. No ponto inicial são dilatados em ampôla, voltam-se para a extremidade caudal e seguem com menor calibre, que permanece mais ou menos constante, até a extremidade posterior, descrevendo ligeiras sinuosidades. Apresentam um comprimento de mais ou menos 15,5 mm. e um diâmetro médio de cêrca de 0,27 mm.

---

(*) Descrição baseada em único exemplar.

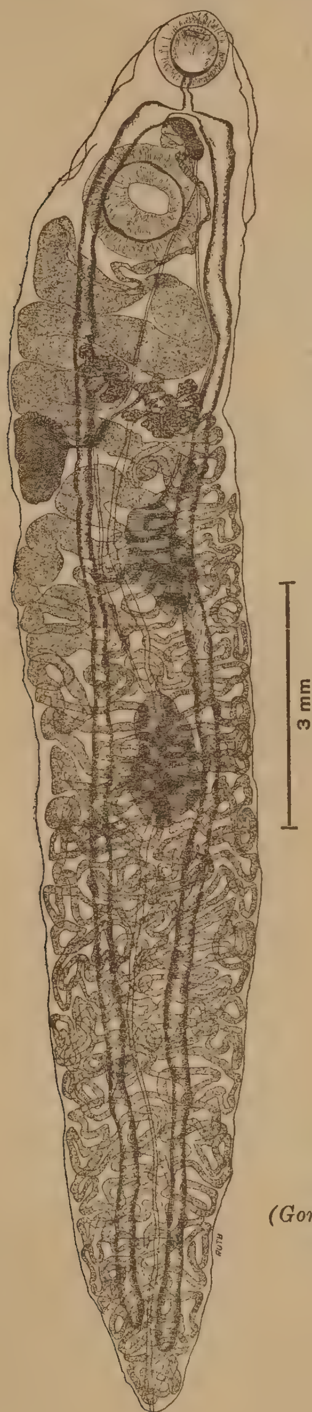



Fig. 1 — *Gorgoderina (Gorgoderina) rochalimai*, n. sp.

Aparelho excretor — Poro excretor, terminal, caudal, sôbre o eixo sagital; em fenda elíptica de maior eixo transverso, medindo cêrca de 0,02 mm. Vesícula excretora, muito longa e delgada, disposta em sentido longitudinal, percorrendo a área intracecal, mais ou menos equidistante aos dois cecos. O seu diâmetro é mais ou menos variável, tendo em média 0,05 mm., atingindo 0,12 mm. nas porções mais dilatadas da vesícula.

Aparelho genital — O poro genital é ligeiramente post-bifurcal adeante do bordo anterior do acetábulo e um tanto deslocado para a direita.

Aparelho genital ♂ — Testículos, são dois, grandes, grosseiramente elipsoidais ou ovoidais, com maior eixo ântero-posterior, contudo de contôrno um tanto irregular. Um anterior e outro posterior. O anterior mede 1,5 mm. de comprimento por 0,82 mm. de largura e o posterior 1,6 mm. de comprimento por 0,93 mm. de largura. Situados na área intracecal, atingindo, às vezes a área cecal de um lado; post-acetabulares com as zonas ocupando mais ou menos a porção mediana do corpo, de modo que o anterior está colocado na metade anterior e o posterior na metade posterior do corpo, tendo campos coincidentes e zonas afastadas. Canais eferentes, partindo da extremidade proximal de cada testículo, muito longos, de paredes delgadas e contôrno cilíndrico, apresentando um diâmetro médio de 0,06 mm. O canal eferente do testículo posterior corre pelo lado direito do animal, junto à parede medial do ceco intestinal direito; na altura do vitelogênio cruza o oviducto e se dirige para frente e para a esquerda, indo encontrar-se com o do testículo anterior na zona acetabular. O canal eferente do testículo anterior percorre o lado esquerdo do corpo, chegando, em certos pontos, a invadir a área cecal correspondente. Canal deferente, único, curto, apresentando um diâmetro equivalente ao dos ductos eferentes. Vesícula seminal, muito grande, formada por dilatação do canal deferente, medindo 0,43 mm. de comprimento por 0,22 mm. de largura. A vesícula seminal abre-se externamente num orifício circular de 0,1 mm. de comprimento. Não existe bolsa do cirro, nem cirro evaginável.

Aparelho genital ♀ — Ovário, post-acetabular e pré-testicular, situado bem lateralmente, na área extracecal direita, mais ou menos na união do têrço anterior com os dois terços posteriores do corpo. De forma ovoidal, com a base voltada anteriormente; medindo cêrca de um milímetro de comprimento por 0,62 mm. de maior largura. Oviducto, parte da face medial do ovário, em forma de tubo cilíndrico de cêrca de 0,033 mm. de diâmetro; de paredes delgadas e percurso a princípio em sentido transverso, depois de atingir a área cecal direita torna-se oblíquo para frente e medialmente, indo, conjuntamente com o ramo comum dos viteloductos, abrir-se, em sentido ventro-dorsal, no ootipo. Útero, tubuliforme, muito longo; parte do ootipo e tem um primeiro trajeto descendente e muito anfractuoso, com situação marcadamente à esquerda da linha mediana, indo até a extremidade caudal, onde assume um trajeto recurrente, ainda muito sinuoso e irregular, conservando mais ou menos o mesmo calibre em toda a extensão; próximo à área testicular adquire um percurso mais uniforme, aumentando muito de calibre e descrevendo grandes alças que partindo da área extracecal direita atingem a área cecal do lado oposto; na altura do bordo posterior do acetábulo, diminue novamente de calibre, dirigindo-se transversalmente para o lado esquerdo; em seguida descreve um grande arco sinuoso, mais ou menos irregular, que pela concavidade olha para o bordo esquerdo do acetábulo, indo terminar junto ao aparelho genital masculino, post-bifurcalmente, um tanto para trás dele, à direita da

linha mediana, por um orifício circular de 0,06 mm. de diâmetro. No adulto as alças uterinas enchem completamente a porção posterior do corpo que fica para trás da zona ovariana.

Anexos ao aparelho genital feminino — Vitelogênio, post-acetabular, pré-ovariano, na área intracecal, com alguns ácinos atingindo as áreas cecais correspondentes, ventralmente à glândula de MEHLIS. Em forma de cachos, um para cada lado, tendo um número regular de ácinos na constituição de cada cacho; em nosso exemplar encontramos dôze ácinos para o vitelogênio da esquerda e sete para o da direita. Os ácinos são piriformes com maior eixo oscilando entre 0,15 mm. e 0,35 mm. ligando-se por canais excretores ao viteloducto correspondente. Os viteloductos são curtos e dispostos transversalmente, medem cêrca de 0,3 mm. de comprimento por 0,04 a 0,06 mm. de largura. Mais ou menos na linha mediana fundem-se em um ducto comum, largo e muito curto, em forma de cone truncado, o qual conjuntamente com o oviducto, com direção ventro-dorsal, vai abrir-se no ootipo. Glândula de Mehlis, volumosa, situada dorsalmente ao vitelogênio, de contôrno mais ou menos esferoidal e compreendida na área intracecal. Ovos, elipsoides, de coloração amarelada nos mais novos e de cor tendente ao castanho nos mais velhos; de casca pouco espêssa e não operculados, medindo em média 0,041 mm. de comprimento por 0,033 mm. de largura.

Esta espécie é dedicada ao Professor H. DA ROCHA LIMA.

Hospedeiro definitivo: — *Bufo paracnemis* (cururú).

Localização: — vesícula urinária.

Procedência: — Umbuzeiro. Estado da Paraíba. Brasil.

Diagnose diferencial — Relativamente à conformação dos vitelogênios, a nova espécie entra para o grupo das de vitelogênio lobado, constituido por *G. vitelliloba* (OLSSON, 1876) LOOSS, 1902, *G. translucida* (STAFFORD, 1902) STAFFORD, 1905, *G. multilobata* INGLES & LANGSTON, 1933 e *G. diaster* (LUTZ, 1926) LUTZ, 1928. Das duas primeiras distingue-se a nova espécie pelo maior número de ácinos vitelínicos que é de 7 a 12, ao passo que em *G. vietelliloba* é de 3 e em *G. translucida*, de 2 a 3; é mais afim de *G. multilobata*, da qual pode ser diferenciada pelos seguintes caracteres, escolhidos entre os mais significativos:

| *G. multilobata* INGLES & LANGSTON | *G. rochalimai*, n. sp. |
|---|---|
| 1 — Comprimento total — 7,1-11,7 mm. | 1 — Comprimento total — 16,6 mm. |
| 2 — Largura máxima — 0,9-2,3 mm. | 2 — Largura máxima — 2,7 mm. |
| 3 — Diâmetro da ventosa oral — 0,35-0,69 mm. (0,47 mm. em média em 14 exemplares). | 3 — Diâmetro da ventosa oral — 0,87 mm. |
| 4 — Diâmetro do acetábulo — 0,60-1,09 mm. (0,82 mm. em média). | 4 — Diâmetro do acetábulo — 1,4 mm. |
| 5 — Acetábulo no primeiro quarto do corpo. | 5 — Acetábulo no primeiro sexto do corpo. |
| 6 — Presença de espinhos na ventosa oral e no acetábulo. | 6 — Ausência de espinhos na ventosa oral e no acetábulo. |

| *G. multilobata* INGLES & LANGSTON | *G. rochalimai*, n. sp. |
|---|---|
| 7 — Ovário intracecal, na parte posterior da metade anterior. | 7 — Ovário extracecal, na parte posterior do terço anterior. |
| 8 — Alças uterinas intracecais na porção que fica anteriormente à vitelária. | 8 — Alças uterinas extracecais até o nível do bordo posterior do acetábulo. |
| 9 — Testículos, ambos na metade posterior do corpo. | 9 — Testículos, o anterior na metade anterior e o posterior na metade posterior, de modo que suas zonas determinam uma faixa passando pelo meio do corpo. |
| 10 — Ovos medindo 0,0271 x 0,0205 mm. | 10 — Ovos medindo 0,041 x 0,033 mm. |

Em relação a *G. diaster*, colocada por WALTON, 1938, na sinonimia de *G. parvicava* TRAVASSOS, 1920, verifica-se não ser acertado tal procedimento, por pertencer esta última espécie ao grupo das de vitelogênios compactos. Infelizmente, o trabalho de LUTZ, 1926, refere como únicos caracteres de sua espécie o "acetábulo enorme" e os "vitelogênios aproximados e ramificados", o que não permite julgar o acêrto com que foi erigida tal espécie, desacompanhada de descrição, desenho ou diagnose diferencial. Mais tarde, LUTZ, 1928, torna a referir-se a *G. diaster*, sem acrescentar novos pormenores para o bom conhecimento de sua espécie, apresentando, entretanto, um desenho, pelo qual pode ser verificada sua grande semelhança tanto com *G. multilobata* como com a nova espécie. A julgar pelo desenho, as dimensões do corpo, ventosas e gonadas correspondem às de *multilobata*, bem como a situação relativa do acetábulo e do ovário e o comportamento das alças terminais do útero; a única afinidade mais estreita com a nova espécie seria a situação relativa dos testículos.

Pensamos que só um reestudo do material do gênero *Gorgoderina* proveniente dos anuros de Maracaí, poderia decidir a situação real desta espécie, ainda tão mal conhecida.

## VESICAL TREMATODES OF AMPHIBIANS FROM BRAZILIAN NORDEAST

### *Abstract*

*In this paper the genus Gorgoderina* LOOSS *is split into two subgenera, Gorgoderina (Gorgoderina) n. subgen. having G. (G.) vitelliloba* (OLSSON, 1876) *as type species and Gorgoderina (Neogorgoderina) n. subgen., with G. (N.) simplex* (LOOSS, 1899) *as type species.*

*In the former subgenus, a new species is described, Gorgoderina (Gorgoderina) rochalimai, n. sp., from a Brazilian toad.*

## BIBLIOGRAFIA

André, E. (*) — 1912 — Recherches parasitologiques sur Amphibiens de la Suisse. I. *Rev. Suisse Zool.*, 20, 471.

André, E. (*) — 1913 — Idem II. Ibid., 21, 179.

Baer, J. G. — 1930 — Deux helminths nouveaux de Uraeotyphlus oxyurus (Gray), Ghymnophione de l'Inde méridionale. *Rev. Suisse Zool.*, 37, 43-52.

Braun, M. G. C. — 1899 — Über Clinostomum Leidy. *Zool. Anz.* 22, 602-603; 484-493.

Cort, W. W. — 1912 — North American frog bladder flukes. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 31, 151-166.

Fuhrmann, O. — 1924 — Deux nouvelles especes de Gorgodera. *Bull. Soc. Neuchâteloise Sci. Nat.*, 49, 431-437.

Guberlet, J. E. — 1920 — A new bladder fluke from the frog. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 39, 142-148.

Holl, F. J. — 1928 — New Trematodes from the newt, Triturus viridescens. *Jour. Helminth.*, 6, 175-182.

Ingles, L. G. — 1936 — Worm parasites of Canadian Amphibia. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 55, 73-92.

Ingles, L. G. & Langston, C. I. — 1933 — A new species of bladder fluke from California frogs. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 52, 243-246.

Johnston, S. J. — 1912 — On some trematodes parasites of autralian frogs. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, 37, 285-362.

Joyeux, C. & Baer, J. G. — 1928 — Notes sur quelques helminths recoltés en Macédoine. *Bull. Soc. Path. exot.*, 21, 214-220.

Joyeux, C. & Baer, J. G. — 1934 — Note sur une nouvelle espece de trématode, Gorgoderina capsensis n. sp. *Rev. Suisse Zool.*, 41, 197-201.

Lewis, F. J. — 1935 — The trematode genus Phyllodistomum Braun. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 54, 103-117.

Looss, A. — 1894 — Die Distomen unserer Fische und Frösche. *Biblioteca Zoologica*, 16.

Looss, A. (*) — 1899 — Weitere Beiträge zur Kenntnis der Trematodenfauna Aegyptens, zugleich Versuch einer natürlichen Gliederung des Genus Distomum Retzius. *Zool. Jahrb. Jena, Abt. Syst.*, 12, 521-784.

Looss, A. (*) — 1902 — Über neue und bekannte Trematoden aus Seeschildkröten nebst Erörterungen zur Systematik und Nomenklatur. *Zool. Jahrb.*, Jena *Abt. Syst.* 16, 411-894.

Lutz, A. — 1926 — Trématodes et oligochètes observés dans les canaux excréteurs des Batraciens de l'Amerique Méridionale. *C. R. Soc. Biol.* 95, 1503.

Lutz, A. — 1928 — Estudios de Zoologia y Parasitologia Venezolanas. Rio de Janeiro, pag. 109.

Lynch, J. E. (*) — 1936 — Phyllodistomum singulare n. sp. a Trematode from the urinary bladder of Dicamptodon ensatus (Escholtz) with notes on related species.

Nybelin, O. V. (*) — 1926 — Zur Helminthenfauna der Süsswasserfische. Schwedens, I Phyllodistomen. *Goetebergs. Kungl. Vetenska sch. vitterhelssamhaelles Hand.* 317-319.

OLSSON, P. — 1876 — Bidrag till Skandinaviens Helminth fauna I. *K. Swenska Vetenska Akad. Handl., Stokholm. N. F.*, 14, 1-35.

OZAKI, Y. — 1926 — On two new genera of frog trematodes Cryptotrema and Microlecithus, and a new species of Pleurogenes. *Journ. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokio, Sect. Zool.*, 1, 33-34.

RANKIN, J. S. — 1937 — New helminths from North Caroline salamanders. *Jour. Parasitol*, 23, 29-42.

RANKIN, J. S. (*) — 1937 a — An Ecological Study of Parasites of some North Caroline Salamanders. *Ecol. Monog.*, 7, 169-269.

SINITZIN, D. F. (*) — 1905 — Beiträge zur Naturgeschichte der Trematoden. Die Distomen der Fische und Frösche der Umgebung von Warschau (Abst. by E. Schultz of 1905 Polish article of 210 pp.) *Zool. Centralbl. Leipzig*, 13, 681-689.

STAFFORD, J. (*) — 1902 — The american representatives of Distomum cygnoides. *Zool. Jahrb. Jena, Abt. Syst.*, 17, 411-424.

STAFFORD, J. — 1905 — Trematodes from Canadian Vertebrates. *Zool. Anz.*, 28, 681-694.

STURGES, MARY M. (*) — 1897 — Preliminary notes on Distomum patellare n. sp. *Zool. Bull., Boston*, 1, 57-69.

TRAVASSOS, L. — 1919-1920 — Novo typo de Telorchinae. *Rev. Soc. Brasil. Sci.*, 3, 189-190.

TRAVASSOS, L. — 1922 — Contribuições para o conhecimento da fauna helmintologica brasileira. XIV. Sobre as espécies brasileiras da familia Gorgoderidae. *Bras. Med.*, 36, 17-19.

TRAVASSOS, L. — 1924 — Contribuições para o conhecimento dos helminthos dos batrachios do Brasil. *Scienc. Med.*, 27, 746-748.

TRAVASSOS, L. — 1928 — Contribuição para o conhecimento das espécies brasileiras do gênero Gorgoderina. *Bol. Mus. Nac.*, Rio de Janeiro, 4, 69-71.

WALTON, A. C. — 1938 — The Trematodes as Parasites of Amphibia. Cont. from the Biolog. Laborat. of Knox College, nos. 61, 62, 63. Mimiografado.

YAMAGUTI, S. — 1936 — Studies of the Helminth fauna of Japan. Part. 14. Amphibian Trematodes. *Jap. Journ. Zool.*, 6, 566-671.

(*) Não consultado o original.

—o—

Vol. 11 — Art. 45 1940

# NOTA SOBRE STREBLIDEOS (DIPTERA) DE MORCEGOS DE MATO-GROSSO, BRASIL

POR

S. B. Pessôa e L. R. Guimarães

Do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Com 6 figuras no texto

Por intermedio do Dr. MARCELLO SILVA JOR., Diretor do Departamento de Saúde do Estado de Mato Grosso., recebeu o Departamento de Parasitologia vários morcegos coletados naquele Estado, em Dezembro de 1938.

Retirámos os ectoparasitas, que verificamos serem exclusivamente Streblideos. Como tais parasitas têm sido pouco estudados naquela região do Brasil, resolvemos anotar as espécies encontradas, seguidas de alguns comentarios que nos pareceram de algum interesse para melhor conhecimento do grupo. Dos dipteros encontrados, dois são pela primeira vez assinalados na America do Sul. Os morcegos examinados representavam apenas tres espécies. De um exemplar de *Chilonycteris personata* WAGNER retiramos o único especimen que possuimos de *Nycterophila coxata* FERRIS, e dos numerosos exemplares das duas outras espécies de morcegos, *Lonchoglossa ecaudata* WIED. e *Carollia brevicauda* WIED., os restantes *Streblideos* de que tratamos nesta nota.

## Genero *Nycterophila* FERRIS

### *Nycterophila coxata* FERRIS, 1916

FERRIS, G. F., 1916, Ent. News, XXVII, n.º 10, p. 437.
KESSEL, Q. C., 1925, Jour. N. Y. Ent. Soc., XXXIII, n.º 1, p. 13.
COSTA LIMA, A., 1921, Arch. Esc. Sup. Agr. e Med. Vet., V, n.º 1, p. 30.

Esta espécie, uma das mais curiosas da familia *Streblidae*, foi descrita por FERRIS de material encontrado em *Macrotus californicus*, da California. KESSEL assinala-a no mesmo hospedeiro e em *Brachyphylla cavernarum*, das Antilhas e em *Chilonycteris rubiginosa*, do Panamá. Encontramo-la (um único exemplar macho) no morcego *Chilonycteris personata* WAGNER de Cuiabá.

Em 1900, revendo a familia *Streblidae*, SPEISER [1] dividiu-a em duas subfamilias: *Nycteriboscinae* e *Streblinae*. Na primeira subfamilia incluiu êle todos os generos do mundo, com excepção de *Strebla* e *Euctonodes*, que foram colocados na segunda subfamilia. Recente-

(1) Über die Strebliden, Fledermausparasiten aus der Gruppe der pupiparen Dipteren. Arch. Naturgesch. 66, 31, 1900.

mente, em 1936, baseando-se principalmente na estrutura da cabeça e das azas, JOBLING (2) retirou da subfamilia *Nycteriboscinae* todos os generos americanos, e agrupou-os em uma nova subfamilia, *Trichobii-*

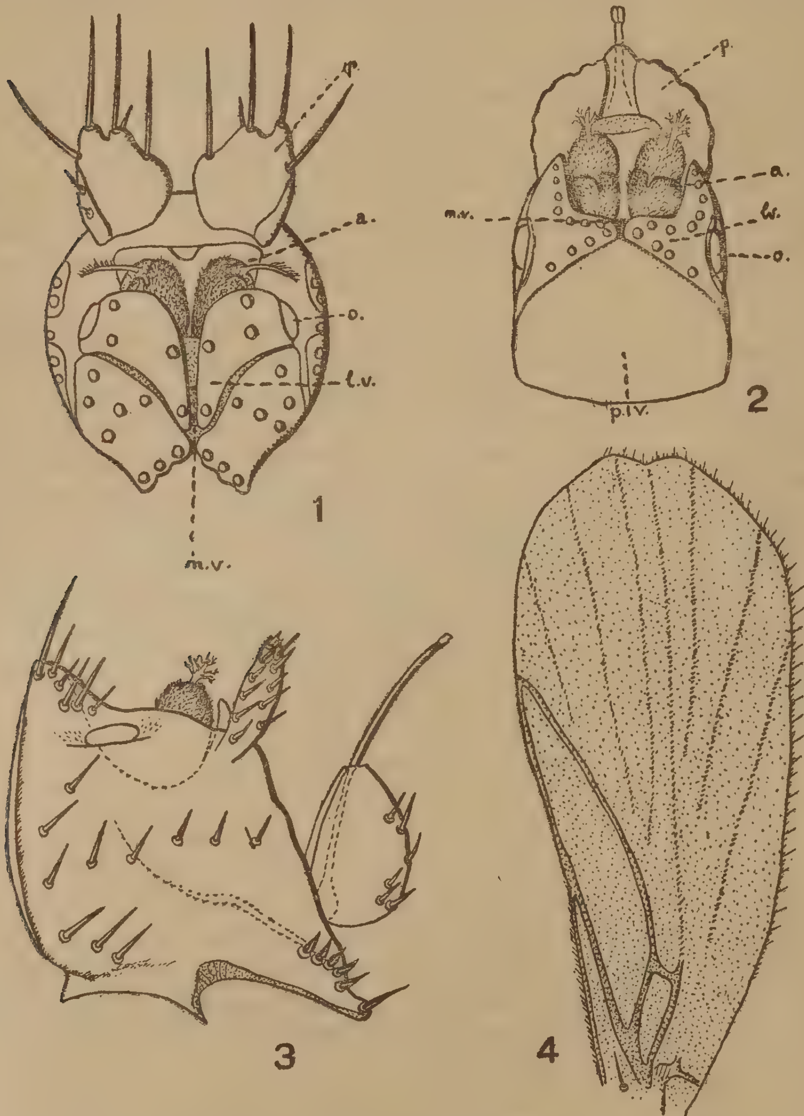
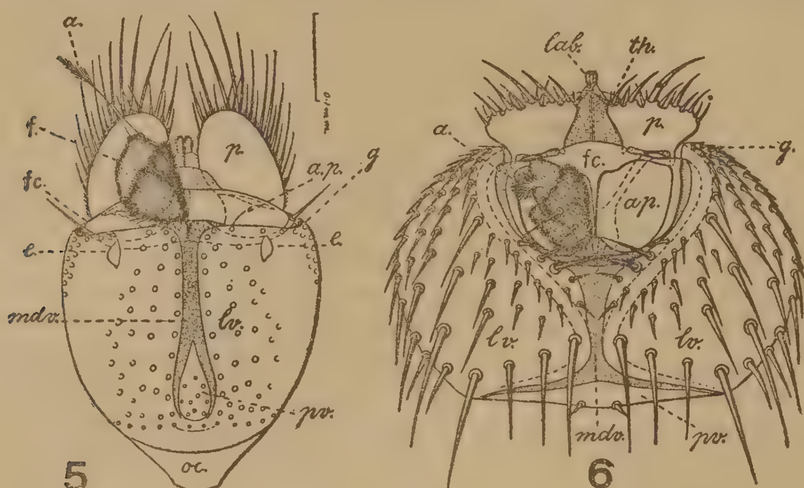



Fig. 1 — *Aspidoptera clovisi* PESSOA & GUIMARÃES, vista dorsal da cabeça.
Fig. 2 — *Nycterophila coxata* FERRIS, vista dorsal da cabeça; Fig. 3 — *Idem*, vista lateral; Fig. 4 — *Idem*, aza.

(2) A revision of the subfamilies of *Streblidae* etc., etc., Parasitology, Vol. XXVIII, n. 3, 355, 1936.

*nae*. Referindo-se á estrutura da cabeça dos generos americanos, JOBLING diz o seguinte: "An examination of the head of the most generalised American genus *Trichobius* shows that it differs structurally from that of the Old World genera. Its laterovertices including the eyes are separated by a membrana posteriorly and laterally from the other regions, and only the dorsal part of the occipital region is convex dorsally". De fato, um exame da fig. 1, representando a cabeça de *Aspidoptera clovisi*, espécie incluida na subfamilia *Trichobiinae*, mostra perfeitamente a divisão dessa cabeça de acôrdo com o critério de JOBLING. Mesmo as espécies de *Trichobius* de estrutura menos especialisada apresentam, na superficie dorsal da cabeça, duas elevações na região do vertex, as quais são separadas por um leve sulco ao longo da linha mediana. Examinando a fig. 2, e fazendo a homologia das diversas regiões, verifica-se que a estrutura da cabeça de *Nycterophila coxata* mais se assemelha às de *Nycteribosca amboinensis* e *Raymondia lobulata* que à de qualquer espécie americana. Descrevendo o postvertex de *R. lobulata* JOBLING expressa-se da seguinte maneira: "In *R. lobulata*, owing to the great dorso-ventral flattening of the head, the postvertex is very much broader than long. Its anterior border is separated by the mediovertex from the other chitinized subregions of the vertex, while posteriorly it is continuous with the occiput". Essa descrição coincide perfeitamente com as formações da cabeça de *Nycterophila coxata*, apesar de ter, esta espécie, a cabeça achatada lateralmente. Outro importante carater em que se baseia JOBLING para separar as duas subfamilias é a estrutura das azas. As azas das espécies da subfamilia *Nycteribocinae* apresentam cinco nervuras longitudinais e duas transversais, enquanto os generos americanos apresentam seis nervuras longitudinais e tres transversais. A aza de *Nycterophila coxata* (fig. 4) apresenta a 1.ª e 2.ª nervuras longitudinais perfeitamente distintas: a 3.ª é menos distinta que as duas primeiras, mas nítida. Entre a 2.ª e 3.ª veias encontram-se 3 outras, pouco nítidas, e interrompidas nas bases. Alem da 3.ª nervura encontram-se mais 3, tambem pouco nítidas, interrompidas nas bases, e parecendo ramos da 3.ª nervura longitudinal. A base da 2.ª longitudinal está em connexão com a da 3.ª por uma nervura transversal. Assim vemos que a aza de *Nycterophila coxata* apresenta, ao todo, nove nervuras longitudinais e uma transversal. Do exposto verifica-se que o genero *Nycterophila* não pode permanecer na subfamilia *Trichobiinae*, do Novo Mundo, pois não apresenta nenhum dos dois caracteres principais dela. Duas alternativas se nos apresentam: ou coloca-lo na subfamilia *Nycteriboscinae*, ou erigi-lo em nova subfamilia. Entretanto, deixamos a questão em

suspenso, opinando para que êle seja, provisoriamente, incluido na subfamilia *Nycteriboscinae,* em vista da morfologia de sua cabeça. Um




Vista dorsal das cabeças de *Nycteribosca amboinensis* RONDANI (5) e *Raymondia lobulata* SPEISER (6), segundo JOBLING.

exame de material mais abundante é entretanto necessário para completo esclarecimento da questão.

### Genero *Aspidoptera* COQUILLET

### *Aspidoptera clovisi* PESSÔA & GUIMARÃES

PESSÔA, S. B. e GUIMARÃES, L. R., 1936, Ann. Fac. Med. S. Paulo, XII, fasc. 2, p. 262.

Como fizemos notar na descrição original desta espécie, é esta a única que possue 6 cerdas escutelares. Todas as outras possuem 4, com excepção de *Trichobius major,* com 8, *Aspidoptera megastigma* e as espécies do genero *Paradyschiria,* que possuem sómente 2 cerdas. A redução das cerdas escutelares parece estar-se processando nesta espécie, como fenómeno de mutação, pois entre cerca de 64 exemplares examinados, verificámos apenas um único com 4 cerdas normais. Examinando minuciosamente este exemplar não verificámos nenhuma outra diferença com relação aos normais. O escutelo é normal e o tamanho das cerdas existentes, igual ao dos exemplares normais. Aliás a redução das cerdas escutelares parece fenómeno mais frequente do que previamos nas espécies do genero *Aspidoptera,* pois, como assinalámos no artigo citado, possuimos um exemplar de *A. phyllostomatis,* que normalmente possue 4 cerdas escutelares, com duas cerdas unicamente.

## Genero *Trichobius* Gervais

### *Trichobius caecus* Edwards

Edwards, F. W., 1918, Ann. Mag. Nat. Hist., I, ser. 9, p. 424.
Kessel, Q. C., 1925, Jour. N. Y. Ent. Soc., XXXIII, n.º 1, p. 16.
Jobling, B., 1929, Parasitology, XXI, n.º 4, p. 417.
Jobling, B., 1938, Parasitology, XXX, n.º 3, p. 371.

Pela primeira vez é esta espécie assinalada no Brasil. E' a 8.ª espécie do genero *Trichobius*, encontrada no Brasil. Até hoje fôra assinalada em Panamá e Trinidad. Examinámos 5 machos e 2 fêmeas.

### *Trichobius dugesii* Townsend

Townsend, C. H. T., 1891, Ent. News, II, n.º 6, p. 106.
Townsend, C. H. T., 1892, Ent. News, III, n.º 7, p. 177.
Kessel, Q. C., 1925, Jour. N. Y. Ent. Soc., XXXIII n.º 1, p. 16, 1936.
Pessôa, S. B. & Guimarães, L. R., 1938, Ann. Fac. Med., S. Paulo, XII n.º 2, p. 257.
Guimarães, L. R., 1938, Rev. Mus. Paulista, XXIII, p. 656.
Jobling, B., 1938, Parasitology, XXX, n.º 3, p. 383.
? *Trichobius mixtus* Curran, 1935, Am. Mus. Nov., n.º 765, p. 10.
Guimarães, L. R., 1938, Rev. Mus. Paulista, XXIII, p. 654.

Seguimos Jobling na determinação desta espécie. Entretanto fizémo-lo com bastante reserva, pois sentimos que ainda ha muita duvida quanto à verdadeira identidade do *Trichobius dugesii*, que só poderá ser resolvida pelo exame do seu tipo.

Examinámos 8 machos e 1 fêmea desta espécie.

## Genero *Strebla* Wied.

### *Strebla vespertilionis* (Fabricius)

*Hippobosca vespertilionis* Fabricius, 1805, Syst. Antliat., p. 339.
*Strebla vespertilionis* (Fabr.) Wied., 1824, Analecta, p. 9.
Macquart, J., Hist. Nat. Ins. Dipt. 1835, II, p. 677.
Rondani, C., 1878, Ann. Mus. Civ. di St. Nat. di Genova, XII, p. 167.
Speiser, P., 1900, Arch. für Nat., Bd. 66, n.º 1, p. 63.
Miranda Ribeiro, A., 1907, Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro, XIV, p. 236.
Kessel, Q. C., 1924, Parasitology, XVI, n.º 4, p. 413.
Kessel, Q. C., 1925, Jour. N. Y. Ent. Soc., XXXIII, n.º 1, p. 29.
Jobling, B., 1929, Parasitology, XXI, n.º 4, p. 423, 1936.
Pessôa, S. B. & Guimarães, L. R., Ann. Fac. Med. S. Paulo, XII, n.º 2, p. 257.
*Strebla wiedmanni* Kolenati, F. A., 1856, Paras. d. Chir., p. 46.
Costa Lima, A., 1921, Arch. Esc. Sup. Agr. e Med. Vet., V, n. 1, p. 31.
*Kolenatia wiedmanni* (Kol.) Rondani, C., 1878, Ann. Mus. Civ. Genova, XII, p. 168.
*Strebla mexicana* Rondani, C., 1878, Ann. Mus. Civ. Genova, XII, p. 168.

Desta caracteristica espécie da subfamilia *Streblinae* examinámos 9 machos e 12 fêmeas.

### Genero *Euctenodes* WATERHOUSE

### *Euctenodes mirabilis* WATERHOUSE

WATERHOUSE, 1879, Trans. Ent. Soc. London, p. 310.
SPEISER, P., 1900, Arch. für Nat. Bd. 66, p. 63.
COSTA LIMA, A., 1921, Arch. Esc. Sup. Agr. e Med. Vet., V, n.º 1, p. 32.
KESSEL, Q. C., 1924, Parasitology, XVI, n.º 4, p. 409.
KESSEL, Q. C., 1925, Jour. N. Y. Ent. Soc., XXXIII, n.º 1, p. 30.
CURRAN, C. H., 1934, Bull. Am. Mus. Nat. Hist., LXVI, p. 523.

Esta espécie já foi encontrada em *Hemiderma perspicillatum,* de Pernambuco, *Phyllostoma hastatum,* do Perú, *Vampirus* sp. e *Desmodus* sp. das Ilhas de S. Lourenço, *Phyllostoma* sp., de Humboldt e *Carollia perspicillatum aztecum,* do Panamá. Já examinámos material encontrado em *Phyllostoma hastatum,* de Ubatuba e *Desmodus rufus,* da Bahia. De Mato Grosso conhecemos apenas o presente lote, composto de 2 machos e 1 fêmea.

———o———

Vol. 11 — Art. 46 1940

# CASO DE UM "PERICHAETIUM" INTERESSANTE NUM MUSGO DO GÊNERO LEUCOBRYUM

POR

F. Rawitscher

Com 8 figuras no texto

Nos arredores de S. Paulo encontra-se um musgo do gênero *Leucobryum* que apresenta "perichaetia" singulares.

Como se sabe, os orgãos sexuais (anteridios e arquegonios) são formados nos ápices das pequenas hastes folhosas que constituem a parte vegetativa das Muscineas. A fig. 1 mostra o corte longitudinal de uma haste masculina, apresentando, entre as folhas apicais, os anteridios que, muitas vezes, estão entremeados com pêlos estereis, as parafises. Cada celula do interior do anteridio deixa sair um anterozoide flagelado, que é obrigado a nadar para alcançar os orgãos femininos.

Assim, a abertura dos anteridios só se dá quando são humidecidos, hidratando-se e dissolvendo-se, nesse caso, as membranas da epiderme. A agua que é esborrifada transporta os anterozoides para os caules femininos, munidos de arquegonios, cuja posição é análoga à dos anteridios, no ápice de hastes determinadas (Fig. 2). — Aliás tambem existem musgos com anteridios e arquegonios na mesma haste.

Os botanicos vêm na existencia de anterozoides, cuja locomoção depende de agua em estado liquido, uma reminiscencia de épocas remotas, em que os antepassados das Bryophytas eram algas. Na vida terrestre foram obrigados a formar adaptações especiais para garantir a reunião dos gametas. Assim, encontramos várias maneiras de armazenamento de agua ao redor dos orgãos sexuais. A fig. 1 mostra, ao lado, um "cálice" masculino de um representante do gênero *Polytrichum,* do qual possuimos várias especies em São Paulo. As folhas terminais que formam o cálice — às vezes chamado impropriamente flor, por ser muito vistoso — têm a base mais larga, formando, no conjunto, um bassinete de funcionamento semelhante ao das rosetas conhecidas de nossas Bromeliaceas. Tais formações, que envolvem os orgãos sexuais, chamam-se *perichaetium* (1).

Cálices de tal maneira vistosos são frequentes no sexo masculino. Aqui o acúmulo de agua deve ser maior e sua conservação mais duradoura, porque a saída dos anterozoides requer tempo. Uma vez chega-

(1) Perichaetium, do grego : peri = ao redor ou envolvendo; chaite = pêlo. Em outros casos, que constituiram a base para tal denominação, encontramos envolucros formados por pêlos ou munidos deles (Hepaticae). Os envolucros dos cálices masculinos, às vezes, são distinguidos pelo nome de *perigonium.*

dos aos arquegonios, aí permanecem com a agua que os veicula nos espaços capilares onde, por quimiotactismo, penetram no colo desses

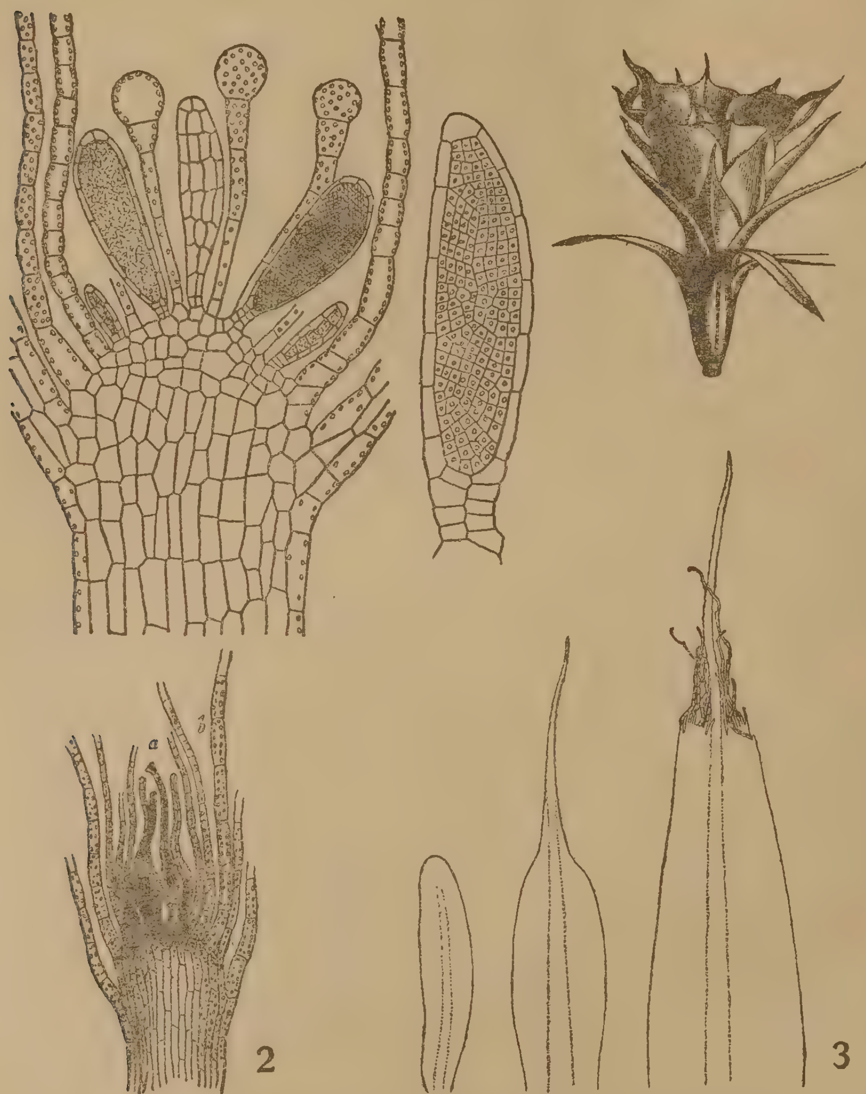



Fig. 1 — *Funaria hygrometrica* — Corte long. de uma haste masculina, com um anteridio em maior aumento. Ao lado, vista geral de uma haste masculina de *Polytrichum alpinum* (seg. SMITH e SCHIMPER). Fig. 2 — *Funaria hygrometrica* — Corte long. da haste feminina, mostrando, entre as folhas, quatro arquegonios (seg. SACHS). Fig. 3 — Folhas de *Diphyscium foliosum*, mostrando a transição da folha normal (à esquerda) até a folha do "perichaetium" (à direita). (seg. GOEBEL).

arquegonios. Para aumentar a eficiencia capilar encontramos, muitas vezes, em ambos os sexos, as citadas parafises.

Existem casos em que os ápices femininos possuem "perichaetia" bem desenvolvidos, com certas modificações das folhas, que servem para melhor humidecimento e conservação da agua. Tais casos, porém, parecem relativamente raros. Assim GOEBEL, na sua "Organografia das Plantas", no II vol. que se dedica especialmente às Bryophytas e Pteridophytas, relata só o caso de dois musgos (pg. 942), *Diphyscium* e *Adelothecium,* do primeiro dos quais reproduzimos as folhas. (Fig. 3). Trata-se de uma observação original de GOEBEL. A descrição diz: "as folhas vegetativas são linguiformes. As folhas do envólucro das flores femininas são muito maiores e mais largas, acabando numa cerda comprida (como as conhecemos nas folhas vegetativas de muitos musgos xerófilos) e têm "cilios" no bordo superior. Estes são aparelhamentos para conservação da agua, conservação essa aqui tão importante quanto no caso das Hepaticas".

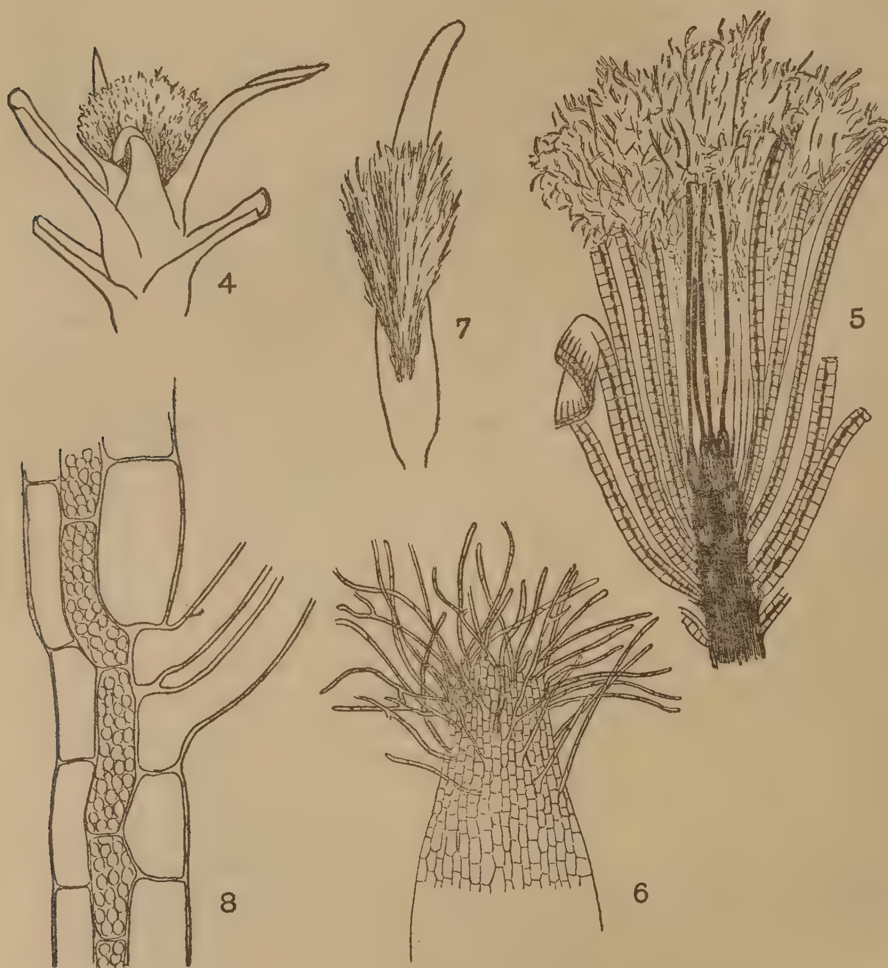
O *Leucobryum* encontrado por nós mostra a adaptação iniciada por *Diphyscium* num desenvolvimento muito mais brilhante.

A fig. 4 mostra a vista geral de um ápice feminino; a fig. 5 um ápice identico no corte longitudinal, vendo-se no centro quatro arquegonios. Toda a parte superior é ocupada por um feltro denso, dentro do qual terminam os cólos compridos dos arquegonios. Esse feltro é formado por pêlos muito longos e às vezes ramificados, formados pelas folhas do "perichaetium" (figs. 6 e 7). Estes pêlos sáem, de preferencia, do lado inferior da folha, originando-se no ápice das folhas interiores do cálice, ao passo que as folhas mais compridas do lado exterior formam o feltro na parte média. Os septos transversais dos pêlos são obliquos como nos protonemas.

Como se sabe, as folhas do gênero *Leucobryum* se distinguem por possuirem duas ou mais camadas de células mortas e perfuradas, destinadas à infiltração da agua. Os pêlos são formados por transformação destas células, especialmente das da camada inferior (fig. 8).

A classificação do musgo descrito, só a podemos dar com certas ressalvas. Outros estados de frutificação, além do descrito, até agora não pudemos encontrar. Na maioria das especies de *Leucobryum,* os esporogonios parecem bastante raros. Na coleção do herbario do Departamento de Botânica do Estado de S. Paulo, confiado à direção do Ilmo. Snr. Dr. F. C. HOEHNE, encontram-se seis espécimens de *Leucobryum* (classificados por TH. HERZOG), entre os quais nossa forma corresponde, macro e microscopicamente, ao *L. sordidum* ANGSTR. Os

exemplares arquivados nada mostram quanto a orgãos de reprodução, de maneira que uma identificação definitiva, por enquanto, será impossivel.




*Leucobryum (sordidum?)* — Fig. 4 — Vista geral de uma haste feminina. Fig. 5 — Corte long. de uma haste feminina. Fig. 6 — Parte apical de uma folha do interior do "perichaetium", vista do lado inferior. Fig. 7 — Folha exterior do "perichaetium". Fig. 8 — Corte long. de uma folha do "perichaetium", mostrando a base de dois pêlos.

Da mesma maneira, não podemos afirmar com toda certeza que o caso por nós observado não se ache descrito na literatura vasta e esparsa que poderia conter tal descrição.

RUHLAND, na 2.ª edição de "Die Natuerlichen Pflanzenfamilien", vol. X (1924), na diagnose da familia das *Leucobryaceae,* chama as folhas do "perichaetium" "pouco diferenciadas" (pg. 220). No gênero *Leucobryum* (pg. 223) descreve as mesmas folhas como "meio-vaginadas" (halbscheidig) e "longi-acuminadas". Assim, o caso aqui apresentado seria até agora desconhecido. Entre os musgos, ilustra, da melhor maneira possivel, o papel do "perichaetium". Supera, tambem, os casos análogos que são conhecidos nas Hepaticas, onde "perichaetia" e periantos laciniados são descritos, especialmente por GOEBEL (l. c., pg. 827, 847, 854, ss.).

## AN INTERESTING CASE OF A "PERICHAETIUM" IN A MOSS OF THE GENUS LEUCOBRYUM


### *Abstract*

*A moss of the genus Leucobryum, found near S. Paulo, which in regard to its vegetative parts corresponds to Leucobryum sordidum* ANGSTR. *(det.* TH. HERZOG) *presents a singular type of perichaetium enveloping the female apex. The leaves of the involucrum form a very dense mass of hairs originated by the cells of the "leucocyst" layer.*

*Apparently the antherozoid-containing water can be stored in this way in the immediate vicinity of the ends of the necks of Archegonia.*


### BIBLIOGRAFIA


GOEBEL, K. — "Organographie der Pflanzen", 2.ª Parte, 3.ª ed., 1929.

HERZOG, TH. — "Contribuição ao conhecimento da Flora Bryologica do Brasil" (Beitraege zur Kenntnis der Moosflora von Brasilien), trad. por F. C. HOEHNE, em "Archivos de Botanica do Estado de S. Paulo", vol. I, fasc. 2, 1923.

RUHLAND. W. — Musci em "Die Natuerlichen Pflanzenfamilien" — Engler u. Prantl — vol. X, 2.ª ed., 1924.


---o---

# ZUR FRAGE DER BEDEUTUNG DES BLEPHAROPLASTS DER TRYPANOSOMEN

VON

Prof. Dr. E. Reichenow, Tropeninstitut, Hamburg

Alle Trypanosomenarten mit Ausnahme von *T. equinum* sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein eines mit den Kernfarbstoffen stark färbbaren Gebildes, das nahe der Geisselwurzel gelegen ist. In der deutschen Literatur wird es als Blepharoplast bezeichnet, was wohl der älteste Name ist, der daher zweckmässigerweise beibehalten wird. Wenn diese Bezeichnung über die Funktion des Gebildes etwas aussagt, was offenbar seiner Rolle nicht entspricht, so ist dasselbe bei allen anderen angewandten Namen, z. B. Centrosom (LAVERAN u. MESNIL), Kinetonucleus (WOODCOCK), Kinetoplast (ALEXEIEFF) der Fall. Am ehesten wäre wohl noch die Benennung Parabasalkörper zu verteidigen.

Nachdem die ältere Auffassung von der Kernnatur dieses Gebildes durch die neueren Forschungen ihre Stütze verloren hat, und verlassen worden ist, neigt man wohl heute allgemein dazu, demselben eine Rolle im Stoffwechsel zuzuschreiben. Beobachtungen von ROSE (1939) an dem mit einer gleichartigen Bildung versehenen Flagellat *Trypanophis* sprechen für eine sekretorische Funktion, wie sie auch bei den Parabasalkörpern anderer Flagellaten angenommen wird. Immerhin zeigt das Organell der Trypanosomen durch seinen nachgewiesenen Chromatingehalt (positive Nuclealreaktion) eine Besonderheit, die uns berechtigt, für dasselbe eine besondere Bezeichnung, nämlich Blepharoplast beizubehalten.

Nun wissen wir, dass der Blepharoplast auch fehlen kann, ohne dass die betreffenden Trypanosomen in ihrem Gedeihen dadurch irgendwie beeinträchtigt erscheinen. Die wichtigste südamerikanische Art, *T. equinum*, der Erreger der Kreuzlähme (Peste de Cadeiras, Mal de Caderas) der Pferde, ist durch Blepharoplastlosigkeit ausgezeichnet. Nach Feststellungen von HOARE u. BENNETT (1937, 1938) kommen auch bei *T. evansi* natürlich blepharoplastlose Stämme vor. Schliesslich kann man, wie zuerst WERBITZKI bei *T. brucei* gezeigt hat, auch durch bestimmte chemische Einwirkungen auf einen Stamm den Blepharoplast in allen Individuen zum Verschwinden bringen. Solche Stämme können durch zahlreiche Tierpassagen fortgezüchtet werden, ohne dass ihr Verhalten durch das Fehlen des Blepharoplasts irgendwie verändert erscheint.

Daraus kann man wohl keinen anderen Schluss ziehen, als dass die Trypanosomen für das Leben in Säugetierblut den Blepharoplast nicht benötigen. Da wir aber nicht wohl annehmen können, dass dieses eine grosse Flagellatengruppe kennzeichnende Organell eine völlig überflüssige Einrichtung ist, so scheint mir die logische Folgerung zu sein, dass der im Säugetierblut nicht erforderliche Blepharoplast unter anderen Umweltbedingungen eine lebensnotwendige Leistung auszuüben hat. Die Trypanosomen leiten sich her von Darmflagellaten wirbelloser Tiere, Arten der Gattungen *Leptomonas* und *Crithidia,* die ebenso wie sie durch den Besitz eines Blepharoplasts ausgezeichnet sind, bei denen man aber bisher blepharoplastlose Arten oder Stämme nicht beobachtet hat. Angenommen, dass unter den Lebensbedingungen im Darm der Wirbellosen der Blepharoplast in Funktion treten muss, so benötigen ihn die Trypanosomen, um sich in ihrem Überträger weiter entwickeln zu können, wenn sie durch dessen Saugakt aufgenommen werden.

Welche Tatsachen sprechen für die Richtigkeit dieser Auffassung? *Trypanosoma equinum,* das sich durch das Fehlen des Blepharoplasts auszeichnet, und *T. evansi,* bei dem gleichfalls völlig blepharoplastlose Stämme vorkommen, sind beide Arten, die eine Entwicklungsfähigkeit in einem wirbellosen Wirt verloren haben und die nur noch von blutsaugenden Insekten rein mechanisch überimpft werden. Bei ihnen konnte also der Blepharoplast ohne Schaden für die Erhaltung der Art verloren gehen.

Abgesehen von diesen extremen Fällen wissen wir, dass blepharoplastlose Individuen in einem gewissen Prozentsatz bei allen pathogenen Trypanosomenarten auftreten können. HOARE u. BENNETT (1937) haben die diesbezüglichen Befunde der verschiedenen Autoren in einer Tabelle zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass — von den bereits erörterten Arten abgesehen — der höchste Prozentsatz blepharoplastloser Individuen, nämlich 16—30%, bei *T. venezuelense* zu finden ist. Auch diese Art wird nur mechanisch von Säugetier zu Säugetier übertragen. Die Meinung von HOARE u. BENNETT, dass *venezuelense* und *equinum* nur durch verschiedengradigen Blepharoplastverlust abweichende Rassen oder Unterarten von *evansi* sind, erscheint mir durchaus begründet.

Wenngleich bei den einzelnen Arten die Häufigkeit des Auftretens blepharoplastloser Flagellaten sehr wechselnd ist, so zeigt sich doch, dass die Arten der *brucei*-Gruppe *(brucei, rhodesiense, gambiense)* mehr zur Bildung solcher Formen neigen als die Arten der *congolense*- oder *vivax*-Gruppe. So wurden bei *brucei* bis zu 10%, bei

*gambiense* bis zu 6 % blepharoplastlose Individuen gezählt, während sich bei *congolense* und *vivax* die Zahl stets unter 1 % hielt. Es ist bemerkenswert, dass *congolense* und *vivax* eine bessere Entwicklungsfähigkeit im Überträger zeigen als die Arten der *brucei*-Gruppe, d. h., dass bei ihnen die Anzahl der infektiös werdenden Glossinen durchschnittlich grösser ist. Auch wissen wir, dass bei den Vertretern der *brucei*-Gruppe die Entwicklungsfähigkeit in der Tsetsefliege wie auch die Wachstumsfähigkeit in der Kultur nach längerem Aufenthalt im Säugetierblut überhaupt verloren geht. Auf den Parallelismus zwischen der Züchtbarkeit der Trypanosomen und ihrer Entwicklungsfähigkeit im Überträger habe ich in verschiedenen Arbeiten hingewiesen (vergl. Reichenow 1939). Über *T. vivax* ist in dieser Beziehung nichts bekannt. Bei *T. congolense* konnte ich jedoch feststellen, dass noch von einem 9 Jahre alten Stamm Dauerkultur zu erzielen war, die jetzt bereits über 5 Jahre alt ist.

Mit diesen Ausführungen ist natürlich nicht gemeint, dass für die Wachstumsfähigkeit der Trypanosomen ausserhalb des Säugetierblutes die wenigen in der Population enthaltenen blepharoplastlosen Formen irgendwie massgeblich wären. Ich meine nur, dass ihr mehr oder weniger häufiges Auftreten ein sichtbares Zeichen dafür sein kann, dass viele oder auch alle Individuen die Vermehrungsfähigkeit im Insektendarm eingebüsst haben. Vielleicht liegen die Dinge so, dass eine physiologische Veränderung der Trypanosomen, die im Verlust der Anpassungsfähigkeit an die Lebensbedingungen im Überträger besteht, die Voraussetzung ist, dass der Blepharoplast verloren gehen kann.

Die Frage, ob der Blepharoplast für das Gedeihen im wirbellosen Wirt notwendig ist, lässt sich auch experimentell prüfen. Wenn es gelingt, von einem Trypanosomenstamm, dessen gute Entwicklungsfähigkeit in der Glossine festgestellt ist, durch Behandlung der Laboratoriumstiere mit einem geeigneten Präparat (z. B. Trypaflavin) einen blepharoplastlosen Zweigstamm herzustellen, so kann man prüfen, ob auch dieser noch in der Fliege zur Entwicklung kommt. Der praktischen Durchführung dieses Experiments steht allerdings die Schwierigkeit entgegen, dass immer nur ein sehr geringer Prozentsatz der Tsetsefliegen infektiös wird, man also mit sehr grossen Fliegenmengen arbeiten müsste. Wesentlich leichter ausführbar ist die Prüfung der Entwicklungsfähigkeit in der Kultur.

Eine andere Schwierigkeit besteht darin, dass es durchaus nicht einfach ist, einen beliebigen Trypanosomenstamm völlig blepharoplastlos zu machen. Ich habe Versuche mit einem frisch isolierten *gambinense*-Stamm ausgeführt, der sowohl leicht züchtbar als auch gut ent-

wicklungsfähig in der Glossine war (*gambiense* D, vergl. REICHENOW 1939). Bei diesem Stamm gelang es den Bemühungen meines Assistenten Dr. WESTPHAL jedoch nicht, völlige Blepharoplastlosigkeit herbeizuführen. Es wurde nur eine solche von 70% erreicht. Als der Zweigstamm diesen Prozentsatz zeigte, habe ich Kulturen angelegt. In allen Röhrchen kamen die Flagellaten ebenso gut zur Entwicklung wie bei dem Ausgangsstamm, doch zeigte sich, dass alle Trypanosomen in der Kultur mit Blepharoplast versehen waren, obwohl doch in dem verimpften Material der grossen Mehrzahl dieses Organell gefehlt hatte. Die Kultur wurde durch 2 Monate fortgeführt und dann abgebrochen, da sich keine Abweichungen gegenüber dem Ausgangsstamm ergaben. Es traten immer nur blepharoplastführende Individuen auf.

Der Ausfall dieses Versuches zeigt jedenfalls, dass nur solche Individuen, die einen Blepharoplast besassen, in der Kultur vermehrungsfähig waren, unter Bedingungen also, die denen im Insektendarm entsprechen.

SCHRIFTTUM

HOARE, C. A. & S. C. J. BENNETT — 1937 — Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. III. Spontaneous occurrence of strains of Trypanosoma evansi devoid of the kinetonucleus. *Parasitology* **29**: 43. — 1928 — IV. Further observations on the absence of the kinetoplast in Trypanosoma evansi. *Parasitology* **30**: 529.

REICHENOW, E, — 1939 — Über die Entwicklungsfähigkeit der Kulturformen von Trypanosoma gambiense und T. congolense in Glossinen. *Arch. Schiffs-u. Trop. - Hyg.* **43**: 197.

ROSE, M. — 1939 — Sur la physiologie de l'appareil parabasal de Trypanophis Grobbeni Poche. *C. r. Acad. Sci. Paris* **208**: 939.

———o———

# QUERATOMICOSE ASPERGÍLICA EPIZOÓTICA EM PINTOS

POR

J. Reis

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 62-73

## 1. INTRODUÇÃO

Em outubro de 1939 tivemos conhecimento de doença um tanto semelhante à coriza, que grassava entre os pintos de aviário situado nas vizinhanças da cidade de São Paulo (caso 6465 da Secção de Ornitopatologia). Num total de mais ou menos mil pintos, que a tanto montava naquela época a população dos pinteiros do citado aviário, cerca de cem foram atacados pela doença. Eram todos pintos novos, de duas a cinco semanas de vida.

Pudemos demonstrar que a doença em questão, que consistia essencialmente em queratite não raro complicada com processos patológicos outros do globo ocular, e mais raramente de outros orgãos (pulmão, sacos aéreos, intestinos, etc.), era produzida pelo *Aspergillus fumigatus* FRESENIUS, 1850 (*). Residia a fonte de infecção na serragem de madeira que havia sido colocada em camada alta no piso dos pinteiros, e se achava intensamente contaminada pelo fungo.

Novo foco da mesma doença foi identificado um mês após (caso 6561 da Secção de Ornitopatologia) em localidade próxima da primeira. Tambem aí havia a particularidade da serragem como fonte de infecção.

Sobre esta doença já publicamos pequena nota em janeiro do ano corrente (5).

Não são comuns casos de queratomicose aspergílica nem no homem nem em animais. Na literatura ornitopatológica não encontramos referência a casos dessa natureza, particularmente com carater epizoótico. Em pintos novos a aspergilose ocorre mais frequentemente sob forma pulmonar, sendo uma das causas da "brooder pneumonia" dos autores norte-americanos, outrora atribuida quasi exclusivamente ao aspergilo, hoje sabidamente ligada tambem a causas outras, aliás mais frequentes que a aspergilose (DOYLE e MATHEWS, BEACH).

(*) A identificação da espécie foi feita pelo professor CHARLES THOM, do Bureau of Plant Industry, Washington D. C., U.S.A.

E' duplo o interesse prático das observações relatadas no presente trabalho: a) separar do complexo clínico "coriza", em que os casos estudados seriam colocados, uma doença definida, com etiologia e epidemiologia próprias; b) demonstrar que a serragem de madeira deve ser totalmente banida do piso dos pinteiros, pois representa fonte sempre provavel de infecção.

## 2. A DOENÇA ESPONTÂNEA

Quando em início, o que se observa é apenas processo irritativo do olho (lacrimejamento, fotofobia) e, na córnea, pequenas granulações esbranquiçadas (fig. *A*, estampa 62). Esses casos geralmente passam despercebidos por causa da insignificância dos sintomas.

A atenção do criador só é despertada para os casos mais evoluidos, em que já existe grande comprometimento do olho.

Nos casos mais simples a córnea apresenta-se opacificada, com ou sem ulceração central, por onde pode surdir o humor aquoso. Nos casos mais complexos, há formação de disco espesso e elevado, amarelado, que toma quasi toda a córnea; nas proximidades da borda desse disco, e tambem distribuidos pelo tecido ainda transparente da córnea, podem ver-se vários focos pequeninos de infecção (fig. *B*, estampa 63).

A câmara anterior do olho é com o tempo invadida pelo processo mórbido, enchendo-se de exsudato inflamatório que a distende, bombeando fortemente a córnea para fora.

Recobrindo a córnea, observa-se frequentemente exsudato amarelo, caseoso, que adere firmemente à sua superfície, deixando ulceração quando retirado. As pálpebras, nesse estado da doença, encontram-se espessadas em consequência de edema e lesões da conjuntiva.

O edema das pálpebras e dos tecidos circunvizinhos, a coleção de exsudato sobre a córnea, a proliferação dos tecidos da conjuntiva, assim como a dilatação da câmara anterior ou a protrusão do globo ocular em consequência do comprometimento dos tecidos perioculares, determinam em vários casos quadro semelhante ao que se observa em casos adiantados de coriza (inchaço das faces, colamento das pálpebras). Mesmo um exame mais detido do olho, nesses casos, não elucida o diagnóstico, pois o que se encontra, ao descolar e separar as pálpebras, é a mesma cousa que nos deparam os casos de coriza: exsudato caseoso e necrose da córnea.

Os casos incipientes, ao contrário, permitem distinguir as duas condições; na coriza há logo de início conjuntivite e sinusite, alem da coriza propriamente dita, não sendo raras as manifestações gerais já nesse período (abatimento, prostração), ao passo que nos casos de que-

ratomicose o que se encontra é apenas, alem da conjuntivite traumática, a queratite típica, que não se encontra no início da coriza.

Nos casos de queratomicose só um dos olhos é, em geral, atacado. Termina o processo pela fusão purulenta do olho, que fica completamente destruido. Em alguns casos ocorre fibrose e mumificação do orgão, que se retrai, conservando todavia vestígios de sua forma e de suas partes; quando tal acontece, a ave mantem as pálpebras sempre fechadas e a face apresenta depressão no lugar correspondente ao olho destruido ou mumificado, de cujo resíduo não mais se isola o fungo.

Os animais atacados de queratomicose mostram-se em geral menos ativos que os normais e em muitos casos a saude se ressente apreciavelmente. Não poucos morrem depois de haverem arrastado por semanas o processo infeccioso do olho.

Apesar de em alguns casos se haver verificado concomitância de lesões pulmonares de aspergilose, não observamos sintomas respiratórios em nenhum dos animais estudados.

Alem da coriza, outros processos podem determinar alterações passiveis de confusão com as aquí referidas a respeito da queratomicose: a infecção local pela *Pasteurella avicida*, raríssima em pintos de criadeira; a avitaminose A, tambem rara nessa idade e nas condições habituais de criação; a forma ocular da difteria.

### 3. ANATOMIA PATOLÓGICA

A. Olho. — Nos casos espontâneos por nós examinados, todos já em adiantada evolução, observamos o seguinte, alem das alterações exteriores já referidas na descrição da doença espontânea:

Nos casos menos adiantados, o exame macroscópico revela córnea infiltrada, mas ainda transparente, com granulações amareladas espalhadas. Microscopicamente (*) nota-se destruição do epitélio corneal, com abundância de micélio grosso e bem corado a crescer para o interior da córnea, na qual se encontra por toda a parte, até mesmo nas camadas mais profundas; o tecido conjuntivo próprio da córnea ainda se apresenta praticamente normal, apenas levemente infiltrado por pseudo-eosinófilos que se distribuem por todo o tecido, isolados e não em aglomerados. Onde se encontra micélio observam-se, alem dos pseudo-eosinófilos, reação histiocítica e células gigantes, tanto na periferia quanto na profundidade. Na parte profunda da córnea nota-se o aparecimento de numerosos vasos.

---

(*) Material fixado em Zenker e corado pela hematoxilina-eosina.

Nos casos mais adiantados, em que a córnea se apresenta totalmente opaca e não raro dilacerada em certos pontos, outras alterações aparecem: a) necrose das camadas superficiais do epitélio da córnea, que se encontram recobertas por exsudato fibrinoso e aderente; b) vascularização intensa das camadas da córnea, tanto profundas quanto superficiais, com formação de zonas de proliferação de tecido conjuntivo rico de células gigantes e pseudo-eosinófilos.

Da córnea o processo geralmente se estende a outras partes do globo ocular.

Na câmara anterior e na iris observa-se processo inflamatório agudo, com enorme quantidade de pseudo-eosinófilos, contrastando a intensidade da reação, aí, com a que se observa na córnea, sendo muito grande a dilatação dos vasos em toda a úvea. Mais raro é encontrar-se material necrótico enchendo toda a câmara anterior, em cujo humor é geralmente abundante o micélio do fungo.

Na zona ciliar, na iris e na coróide observa-se reação do tipo que ocorre no pulmão e nos casos aéreos e que será descrita mais adiante: esses tecidos são invadidos por tecido de granulação, ricamente vascularizado, em cujo seio se aninham os nódulos típicos da aspergilose, em todos os seus aspetos evolutivos. Tal tecido de reação parece encontrar, no olho, ambiente altamente favoravel à sua proliferação, pois acaba invadindo praticamente todo o orgão, cuja cavidade posterior penetra, subvertendo-lhe toda a estrutura: as células pigmentadas da coróide encontram-se completamente separadas e a retina, em muitos casos, completamente destruida. Nesse tecido de granulação deparam-se, alem dos numerosos vasos, células gigantes, pseudo-eosinófilos, micélio e ainda grandes áreas de necrose.

Em um dos casos examinados pode ver-se o processo estender-se da cavidade posterior do olho à conjuntiva, forçando, à maneira de cunha, a zona da articulação da cartilagem com o anel ósseo da esclerótica (fig. *D*, estampa 66). Esta zona de articulação, normalmente estreita, acha-se grandemente aberta, e entre o osso e a cartilagem há abundância de tecido de granulação com células gigantes. Pode ainda ver-se que o tecido ósseo da esclerótica apresenta em vários pontos sinais evidentes de destruição, por processo de reabsorção lacunar (fig. *C*, estampa 66).

Nos casos de infecção experimental, observa-se o seguinte:

I n f e c ç ã o  i n t r a c o r n e a l: O ponto de inoculação (picada de agulha) é facilmente reconhecido pela efração da córnea e existência de canal no tecido desta, assinalado por infiltração de pseudo-eosinófilos e micélio. Na extremidade inferior desse canal ob-

serva-se o *disco* principal, formado pela proliferação dos esporos aí depositados. O disco é formado quasi exclusivamente de trama miceliana, em taça, com reação quasi nula em torno (figs. *D* e *A* das estampas 65 e 66, respetivamente). Na vizinhança desse disco há abundância de micélio, que se desenvolve em todas as direções; espalhadas no tecido corneal encontram-se células gigantes solitárias.

Na câmara anterior, reação inflamatória intensa com abundância de micélio.

Infecção por escarificação. Esses casos são muito interessantes, pois permitem observar a penetração do micélio através do epitélio lesado. Nesses pontos observa-se que as células epiteliais se apresentam degeneradas e entre elas se formam inúmeras vesículas. Entre as células epiteliais afastadas pelo traumatismo, insinua-se o micélio, cercado de células histiocíticas que o abraçam em toda a sua extensão, e de pseudo-eosinófilos. Através do epitélio, o micélio penetra o tecido conjuntivo da córnea, provocando aparecimento de células gigantes que o englobam, e de pseudo-eosinófilos, assim como de capilares túrgidos de sangue. Logo abaixo do epitélio, especialmente na borda da córnea, nota-se infiltração de vasos em meio de tecido conjuntivo adventício e frouxo, ricamente infiltrado de células redondas.

E' curioso notar que na câmara anterior e iris a reação inflamatória é muito mais intensa, e o micélio muito mais abundante, do que na córnea. Às vezes, junto de uma córnea apenas com discretas lesões e onde são raros os filamentos micelianos, depara-se reação berrante dentro da câmara anterior e na iris, abundantemente invadidas pelo fungo.

B. Pulmão e sacos aéreos — Tambem encontramos lesões aspergílicas nos pulmões e sacos aéreos de alguns dos pintos, o que era, aliás, de prever, dada a conhecida sensibilidade do aparelho respiratório das aves à infecção pelo *Aspergillus fumigatus.*

Dos onze pintos examinados, dois apresentavam lesões macroscópicas do pulmão e sacos aéreos. Mostravam-se os pulmões semeados de nódulos esbranquiçados, cujo tamanho varia desde o de cabeça de alfinete até mais ou menos um milímetro de diâmetro. Esses nódulos, que fazem saliência na superfície do orgão e tambem se encontram em sua massa, podem fundir-se formando então maciços de conteudo caseoso e de forma irregular. Entre os nódulos, o tecido pulmonar mostra-se intensamente congesto e, em certos pontos, apresenta áreas enfisematosas.

As alterações dos sacos aéreos consistem em depósito de exsudato amarelado, caseoso, na cavidade, e formação de nódulos arredon-

dados, branco-amarelados, nas paredes; os sacos comprometidos eram, num caso, os superiores ventrais e, noutro, os médios superiores e inferiores.

Em três de seis pintos cujos pulmões se apresentavam normais ao exame macroscópico, revelou o exame histológico a presença de infecção aspergílica.

Em um pinto de dois meses, criado no mesmo pinteiro e nas mesmas condições dos acima referidos, e que adoecera um mês após estes, quando a epizootia de queratomicose já havia sido debelada, tambem observamos alterações pulmonares, não havendo nesse caso comprometimento dos olhos.

Conforme se verá no capítulo sobre transmissão experimental, em vinte e três pintos de seis dias colocados sobre a serragem contaminada usada nos pinteiros em que a doença se manifestou, um desenvolveu forma pulmonar pura, morrendo em oito dias com lesões patentes.

Histologicamente, as lesões específicas observadas no pulmão correspondem às descritas por NICOLAUS em seu estudo sobre histogênese das lesões aspergílicas na galinha.

Nos casos mais antigos, quasi todo o pulmão está tomado por nódulos muito típicos, assim constituidos: a) no interior, apresentam em alguns casos aglomerados de células epitelióides tendo de permeio pseudo-eosinófilos degenerados e células gigantes, e em outros casos, provavelmente mais evoluidos, substância fortemente eosinófila, amorfa, cercada de células gigantes e grandes sincícios, e deixando ver, às vezes muito nitidamente, o micélio do fungo em seu interior (estampa 73); dentro das células gigantes tambem é possivel reconhecer fragmentos mal corados de micélio, sob a forma de curtos filamentos ou globos hialinos com parede espessa; b) na periferia, envolvendo o "centro" acima descrito, observa-se tecido frouxo, constituido de histiócitos e fibrócitos, no qual dominam elementos fusiformes com prolongamentos, tendendo a achatar-se e arredondar-se à medida que se aproxima do centro; diversos "centros" podem ser englobados na mesma trama histo-fibrocítica, constituindo-se assim grandes áreas ocupadas exclusivamente pelo tecido de reação ao aspergilo; em torno de alguns nódulos é possivel observar reação linfocítica pronunciada (fig. *A*, estampa 69); não se encontra geralmente cápsula fibrosa conspícua.

Nos casos mais novos, em que boa parte do pulmão ainda se encontra normal, pode observar-se com mais frequência um tipo de nódulo diferente dos acima descritos, e que corresponde aos estados

iniciais da infecção, segundo NICOLAUS: trata-se de simples acúmulos de histiócitos e leucócitos pseudo-eosinófilos, sem nenhuma reação em torno (estampa 70). Num pinto que, colocado sobre serragem de madeira contaminada pelo aspergilo, adoeceu e morreu em oito dias, o pulmão apresentava apenas os tipos de nódulos formados respetivamente pelo acúmulo de pseudo-eosinófilos e histiócitos e pela aglomeração de células gigantes.

Quanto à disposição no parênquima pulmonar, observa-se, nos casos incipientes, que os nódulos se localizam subepitelialmente, nas proximidades da cavidade dos parabrônquios e átrios, nelas fazendo às vezes saliência (fig. *B*, estampa 69).

As demais alterações observadas no pulmão dependem da extensão das lesões específicas e consistem em alveolite, congestão e enfisema.

Nos sacos aéreos as alterações específicas são idênticas às do pulmão. Os nódulos aspergílicos localizam-se subepitelialmente, afastando cada vez mais o epitélio da mucosa e fazendo saliência na luz dos sacos. O tecido de granulação que se forma em torno dos nódulos aspergílicos, estende-se por vastas áreas, em cuja intimidade se observam grandes zonas de necrose cercadas por focos de células epitelióides e gigantes e por inúmeros capilares túrgidos de sangue (fig. *D*, estampa 67).

C. Outros orgãos — Nos casos espontâneos de queratomicose por nós estudados, em geral não havia outras lesões alem das já descritas. Merecem apenas referência: a) a observação, em dois casos, de comprometimento da região posterior no nariz e dos seios nasais adjacentes, cheios de exsudato caseoso; b) em um caso, glomerulite capilar no rim; c) em outro caso, amiloidose generalizada, particularmente notória no rim, fígado e baço, notando-se tambem no fígado áreas de degeneração gordurosa e necrose; d) no mesmo caso anterior, existência de divertículo no intestino, de um milímetro mais ou menos de comprimento, cheio de material necrótico; o exame histológico revela necrose da mucosa, toda ela tomada por um processo diftérico; na massa necrótica há grande quantidade de pseudo-eosinófilos e células gigantes, assim como de micélio em sua periferia, junto à parede da mucosa; na parte profunda da mucosa nota-se congestão dos vasos e aparecimento de diversos aglomerados de pseudo-eosinófilos; e) em um dos pintos experimentalmente infectados por inoculação corneal, observamos focos de necrose no fígado, sem carater específico.

## 4. PESQUISA E ISOLAMENTO DO FUNGO

Pode o cogumelo ser revelado a fresco nas lesões da córnea. E' necessário, porém, microscopar com atenção, pois o micélio apresenta refringência muito próxima da do tecido próprio da córnea, de modo que facilmente passará despercebido ao observador menos atento. Em alguns casos, só foi possivel revelar o fungo depois de cuidadosa dissecção do tecido corneal e compressão forte, entre lâmina e lamínula, desse material suspenso em lactofenol. Em tais preparados a fresco o cogumelo apresenta-se como grandes massas micelianas (fig. *B*, estampa 64) sem orgãos de frutificação. Em esfregaços de córnea corados pelo método de Giemsa é possivel reconhecer filamentos micelianos mal corados cercados de células histiocíticas.

O isolamento do cogumelo consegue-se facilmente em qualquer dos meios sólidos usuais na rotina dos laboratórios bacteriológicos. Do catarro ocular colhido em um dos pintos ainda vivos, o fungo foi isolado por semeadura em placa de agar-sangue, a qual ao fim de quarenta e oito horas apresentava, ao lado de colônias de bactérias diversas, numerosas colônias já frutificadas de *Aspergillus fumigatus*. Em todos os outros casos foi o fungo isolado em agar de Czapeck, por semeadura direta, seja da córnea doente, seja do pulmão com alterações macroscópicas patentes.

De um dos pintos doentes isolamos da córnea, ao lado do *Aspergillus fumigatus*, dois outros cogumelos, os quais não se mostraram patogênicos para os pontos: *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp. (*).

O isolamento do fungo a partir da serragem usada no piso dos pinteiros foi tentado do seguinte modo: a) depois de misturada com igual volume de água esteril, foi a serragem triturada cuidadosamente e semeada por esgotamento em placas sucessivas da agar Czapeck: os resultados não foram satisfatórios, pois as placas foram invadidas por bactérias e colônias de penicilos; b) uma pitada da serragem foi diretamente espalhada por esgotamento em seis placas sucessivas de meio de Bordet para isolamento do bacilo da coqueluche; este meio, muito ácido, impede de maneira notória o desenvolvimento de muitas bactérias e, em nossa experiência, já se havia mostrado ideal para isolamento de certas Eremascáceas Imperfeitas produtoras de "sapinho" em aves; os resultados foram ainda aquí muito satisfatórios e o aspergilo foi isolado com facilidade das últimas placas; do meio de Bordet, era o fungo transferido para tubos de agar de Czapeck e aí conservado para identificação.

---

(*) Determinados pelo dr. R. Drummond Gonçalves, da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico.

## 5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Negativos foram os resultados das experiências de contágio pela simples cohabitação de pintos normais com pintos doentes, mesmo quando mantidos em gaiolas pequenas.

Tambem foram negativas as experiências de infecção de pintos de vinte dias pela inoculação do catarro ocular ou tecido corneal de animais doentes, feita dos seguintes modos, em lotes de tres pintos: a) simples instilação ocular; b) simples instilação nasal; c) instilação do material em olho cuja córnea fora levemente escarificada; d) simples deposição, sob a nictitante de pinto normal, do material caseoso retirado do olho doente; e) mesma experiência acima, em olho levemente escarificado.

De vinte e tres pintos colocados sobre serragem contaminada, colhida no piso dos pinteiros em que a doença se manifestara, apenas um contraiu a infecção na córnea, num período de sete dias. Um outro contraiu aspergilose pulmonar, sem comprometimento do olho, e morreu em oito dias. Todos esses pintos já tinham seis dias de idade quando colocados sobre a serragem contaminada.

Deu os seguintes resultados a inoculação de culturas puras de *Aspergillus fumigatus*:

Inoculação na câmara anterior: — Injeção de 0.03 cc. de suspensão espessa de esporos na câmara anterior acarreta inflamação aguda e fusão purulenta do olho em cerca de dez dias. Ao fim de uma semana a córnea apresenta-se opacificada e completamente espessada. Reproduz-se aquí o quadro bem descrito no coelho por L. Renon.

Inoculação intracorneal: — Consistiu na deposição de uma gota da suspensão acima referida dentro do tecido corneal, feita com agulha muito fina introduzida na região límbica paralelamente à superfície da córnea. No dia seguinte, observa-se nos pintos e frangos assim inoculados irritação do olho (lacrimejamento, fotofobia) e tambem infiltração leve da córnea ao nivel da picada. Ao fim de três dias é possivel observar aparecimento de mancha opaca ao nivel da picada e do ponto em que o material infectante foi depositado, a qual aumenta formando "disco" típico e acabando por infiltrar toda a córnea. Já foi descrito em outro local o aspeto histológico desses casos. Ao fim de uma semana existe panoftalmia, eventual descolamento da córnea e fusão do olho. Alguns animais sucumbem.

Inoculação corneal por escarificação: — De suspensão espessa de esporos de *A. fumigatus* depositam-se umas três

gotas sobre a córnea profundamente escarificada, fazendo-se depois massagem sobre as pálpebras. De sete pintos e frangos assim inoculados apenas um escapou à infecção. Foi a seguinte a evolução do processo observado: nos três primeiros dias, irritação geral do olho e infiltração ao longo das escarificações que se vão progressivamente tornando mais visiveis. Aos seis dias mais ou menos, infiltração difusa da córnea e aparecimento de granulações brancas esparsas. Examinando o olho com lupa, nessa ocasião, pode ver-se perfeitamente a difusão do processo a partir das linhas de escarificação (fig. *E*, estampa 63). Finalmente sobrevem ulceração da córnea e infecção generalizada do olho. No curso de tal processo desenvolve-se em alguns animais edema lateral da cabeça, em torno dos olhos, simulando coriza (fig. *G*, estampa 63). Um dos pintos inoculados só veiu a manifestar doença vinte e cinco dias após inoculação.

Em uma das sete aves inoculadas, observamos aparecimento nos músculos esterno-traqueal e cervical, de nódulos caseosos produzidos pelo aspergilo, que deles foi isolado.

Inoculação de Botrytis sp. e Penicillium sp.: — Nada apresentaram de importante os pintos e frangos inoculados com as amostras de *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp. que haviam sido isolados ao lado do aspergilo, de um dos pintos por nós examinados. As aves inoculadas intracornealmente apenas revelam no dia imediato irritação geral do olho, a qual regride sem que se note qualquer alteração da córnea. As aves inoculadas na câmara anterior com 0.1 cc. de suspensão espessa de cultura apresentam no dia seguinte fotofobia, lacrimejamento e turvação da câmara anterior, fenômenos que logo regridem, desaparecendo em três dias sem deixar vestígio no caso das aves inoculadas com *Botrytis* sp, ou apenas deixando pequenino leucoma ao nivel do ponto de inoculação, no caso de penicilio.

Inoculação de Aspergillus flavus: — A inoculação intracorneal de uma amostra de *A. flavus* (*) reproduz o quadro patológico da infecção pelo *A. fumigatus.*

## 6. PATOGÊNESE E DISSEMINAÇÃO. PROFILAXIA

Conforme assinalamos na introdução, a serragem de madeira colocada em camada alta sobre o piso dos pinteiros pode ser responsabilizada como veículo da infecção nos dois surtos observados. As pequenas partículas de madeira são altamente irritantes para os olhos dos pintinhos em contato com a serragem: logo depois de sobre elas

(*) Amostra por nós isolada de aspergilose pulmonar de papagaio e identificada pelo Prof. C. Thom, do Bureau of Plant Industry, U. S. A.

colocados, começam a coçar as pálpebras, repetidamente. E' possivel que a inoculação do aspergilo na córnea se dê ou pela penetração das partículas de madeira na córnea, ou por eventuais escarificações feitas pelo próprio animal no ato de coçar os olhos.

Não foi possivel evidenciar a existência de qualquer afecção ou infecção outra que, agindo previamente sobre os tecidos corneais, pudesse aí crear condições favoraveis à implantação do aspergilo, que seria em tal caso microorganismo de infecção secundária A hipótese de infecção simultânea pelos germes produtores da coriza infectuosa foi especialmente considerada e afastada, pelo não encontro dos agentes específicos (corpúsculos cocobaciliformes, hemófilo) e pela não reprodução da doença pela inoculação ocular e nasal de exsudatos oculares de pintos doentes.

Convem lembrar que muitos surtos epizoóticos de aspergilose pulmonar teem sido tambem relacionados com o uso de "camas" contaminadas, no piso dos pinteiros. Assim, THOM e CHURCH referem que veterinários do Departamento de Indústria Animal dos Estados Unidos encontraram na palha mofada dos abrigos de pintos a fonte de uma epizootia de aspergilose pulmonar; os mesmos autores tiveram ocasião de isolar o aspergilo do solo de vários galinheiros onde a doença fora observada. SAVAGE e ISA demonstraram que num surto grave de aspergilose pulmonar a fonte de infecção estava na ensilagem de milho, contaminada pelo aspergilo, com a qual se cobrira o piso dos abrigos (*). Em surto estudado na Argentina por OTERO e KOPPISCH, foi o bagaço de cana, com que se forraram os ninhos, o responsavel pela doença dos pintos.

A profilaxia recomendavel, e que nos casos por nós estudados deu resultado eficaz, consiste naturalmente em retirar a serragem dos abrigos das aves e proscrever totalmente o seu uso.

## EPIZOOTIC KERATOMYCOSIS IN CHICKS CAUSED BY "ASPERGILLUS FUMIGATUS"

*Abstract*

*This paper contains a report on two outbreaks of a curious disease which may simulate fowl coryza because of some of the alterations it produces in and around the eyes.*

*The disease, which attacked nearly 100 chicks in a brooder-house the whole population of which was at that moment 1,000 birds, consisted essentially of a keratomycosis produced by Aspergillus*

(*) O vocábulo ensilagem é aquí usado não no sentido de ato de ensilar, mas para traduzir o sentido todo especial que teem em inglês expressões como *corn silage*, *rye silage*, etc.

*fumigatus. In some cases the lungs and air-sacs were also affected, displaying the condition known as mycotic brooder pneumonia, although no important respiratory symtoms could be detected.*

*The disease manifests itself in the very beginning by the appearance of small white patches in the cornea, which spread and finally infiltrate the whole tissue. As the disease progresses one can notice swelling of the face around the diseased eye and collection of a viscid, and later caseous, exudate which may seal the lids and make them bulge. The bulging of the lids may also result from the protrusion of either the whole eye-ball or of the anterior chamber of the eye. At this stage, especially when sinusitis develops, the disease may be easily confused with fowl-coryza, localized fowl-cholera infection, diphtheria and even vitamin A deficiency, if one is confined to the observation of symtoms alone.*

*The microscopical examination of the infected corneal tissue shows the myceliad network of the fungus embedded in the tissue of the cornea. The examination should be carefully made in order to prevent overlooking the fungus, for the refringency of its mycelium seems very close ta that of the corneal tissue.*

*The author minutely describes the specific microscopic lesions the infection brings about in the eye both in spontaneous and experimental cases, as well as those found in the lungs and air-sacs, and the non-specific ones which are sometimes met with in other organs (necrotic foci in the liver, amyloidosis in the liver, spleen and kidneys, etc.).*

*The pathogenic power of the strains of A. fumigatus isolated from the two outbreaks here reported has been experimentally studied and it was shown that the disease can easily be reproduced by dropping a few drops of a suspension of spores of Aspergillus fumigatus as well as of A. flavus (strain isolated from lung aspergilosis in a parrot) on the scarified cornea. Two other strains of different fungi (Botrytis sp. and Penicillium sp.) which were found associated with A. fumigatus in one case, did not show any pathogenic power even when inoculated intracorneally or into the anterior chamber of the eye.*

*The source of the infection was found to be the sawdust which was being used as litter on the bottom of the brooders. Clean sawdust, i. e., the sawdust directly received from the sawmill and not yet soiled by the chicks, which had been kept in stock to be changed for the soiled litter when necessary, was brought to the laboratory and searched for the presence of A. fumigatus. A pinch of sawdust was*

*spread on six sucessive plates of Bordet's medium for the isolation of pertussis, which proved better than Czapeck's agar for our special purpose, and the aspergillus could easily be isolated from the last plate.*

## BIBLIOGRAFIA


1 — BEACH, B. A. — 1920 — Chick pneumonia. *Veter. Med.* (Chicago), 25, (12), 546-547.

2 — DOYLE, L. P. e MATHEWS, F. P. — 1928 — The pathology of bacillary white diarrhea in chicks. *Purdue Univ. Agric. Exp. Station Bul.*, 323, 16 pp.

3 — NICOLAUS, W. — 1933 — Ueber Histogenese und Altersbestimmung der durch *Aspergillus fumigatus* hervorgerufenen Veränderungen bei Hühnern. *Zeits. f. Infktk. Haust.*, 45, 191-209.

4 — OTERO, P. M. e KOPPISCH, E. — 1934 — La aspergillosis en el pollito. Estudio preliminar. *8.ª Reun. Soc. Arg. Patol. Reg. del Norte*, Buenos Aires, 1.ª mitad. pp. 143-159.

5 — REIS, J. — 1940 — Queratomicose epizoótica em pintos. *O Biologico*, 6, (1), 38.

6 — RENON, L. — 1897 — Étude sur l'aspergillose. Masson et Cie., Paris, pag. 120.

7 — SAVAGE, A. e ISA, J. M. — 1933 — A note on mycotic pneumonia of chickens. *Scient. Agric.* (Ottawa), 13, 341.

8 — THOM, C. e CHURCH, M. B. — 1926 — The Aspergilli. Williams and Wilkins Co, Baltimore, pp. 80-81.


## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

As fotomicrografias foram feitas por A. Federman. As demais, por B. Mazza filho, do Serviço de Fotografia do Instituto Biológico.

### Estampa 62

*A-F* — Cabeças de pintos com queratomicose aspergílica espontânea. *A*: granulações na córnea. *B:* exsudato caseoso bombeando as pálpebras. *C* e *D:* inchaço da face, semelhando coriza. *E:* protrusão do olho, cuja córnea está completamente opacificada e umbilicada no centro. *F*: espessamento das pálpebras, como na avitaminose A.

### Estampa 63

*A-F* — Córneas com lesões típicas. *A, B, C, D, F*: doença espontânea. Notar ulcerações grande em *A, C, F*. Em *B*, observar o grande "disco" com granulações na vizinhança. Em *D*, pequenina erosão de margens infiltradas, possivelmente ponto de penetração do fungo. *E:* córnea de pinto experimentalmente infectado por escarificação: notar as escarificações e em torno delas a infiltração do fungo. *G*: cabeça de frango com infecção experimental.

### Estampa 64

*A* — Pulmão com lesões típicas, muito aumentado. *B*: micélio do fungo em preparado a fresco, de tecido corneal. *C*: epitélio da córnea doente, mostrando destacamento do epitélio. *D*: lesão necrótica da córnea com micélio. *E*: câmara anterior do olho, mostrando aglomeração de pseudo-eosinófilos e micélio. *F:* câmara da córnea e câmara anterior mostrando micélio na córnea e câmara anterior. A figura *E* é ampliação de um determinado ponto desta.

Estampa 65

*A, B, C* — Infecção experimental por escarificação: notar penetração do aspergilo assinalado por setas. *D*: "disco" de aspergilose na córnea, caso experimental de inoculação intracorneal. *E:* córnea com micélio e infiltração de pseudo-eosinófilos, caso experimental.

Estampa 66

*A* — Grande aumento do "disco" da figura *D* da estampa 65. *B:* borda de um nódulo típico do pulmão. Ausência de cápsula fibrosa. *C:* reabsorção do osso da esclerótica pelo tecido de granulação. *D*: brecha aberta entre a cartilagem e o osso da esclerótica.

Estampa 67

*A* — Corte da região da zona ciliar. *B*: nódulo pulmonar colocado subepitelialmente junto da luz de parabrônquio. *C*: iris com infiltração e aderência ao cristalino. *D*: saco aéreo com reação intensa, mostrando tecido de granulação e zona de necrose. *E*: coróide, com grande zona de necrose.

Estampa 68

*A* — Pulmão mostrando quatro nódulos em estados evolutivos diversos, sendo o de cima simples aglomeração de pseudo-eosinófilos. *B*: corte do pulmão de caso muito avançado, mostrando invasão total do parênquima por nódulos típicos. *C*: parte do nódulo pulmonar mostrando reação alveolar em torno. *D*: saco aéreo, vista geral de um nódulo que ocupa a luz do orgão.

Estampa 69

*A* — Nódulo com reação linfocítica em torno. *B:* foco de necrose no fígado. *C*: amiloidose do fígado. *D*: tecido atelectasiado entre nódulos. Parabrônquios com hemorragia. *E*: amiloidose do rim.

Estampa 70

Nódulo inícial: coleção de pseudo-eosinófilos.

Estampa 71

Nódulo pulmonar mostrando células epitelióides e pseudo-eosinófilos.

Estampa 72

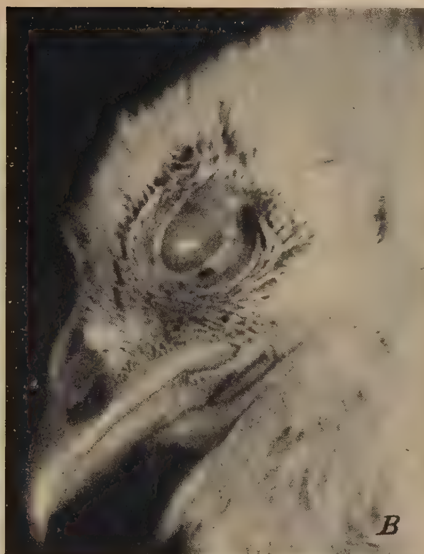
Nódulo mostrando micélio, material necrótico e células gigantes em torno.

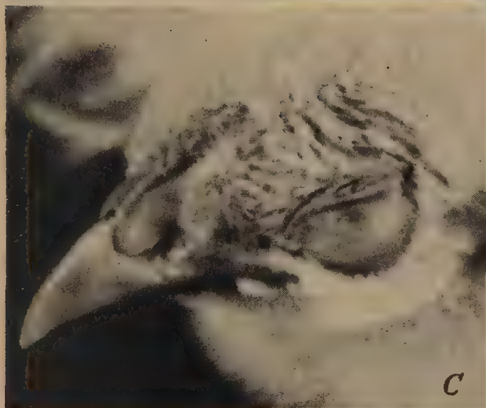
Estampa 73

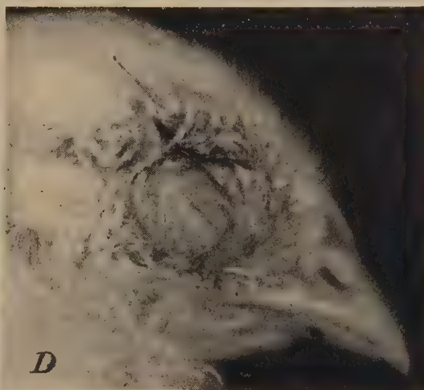
Nódulo muito adiantado, mostrando abundância de micélio em seu interior.

———o———


A


B


C


D

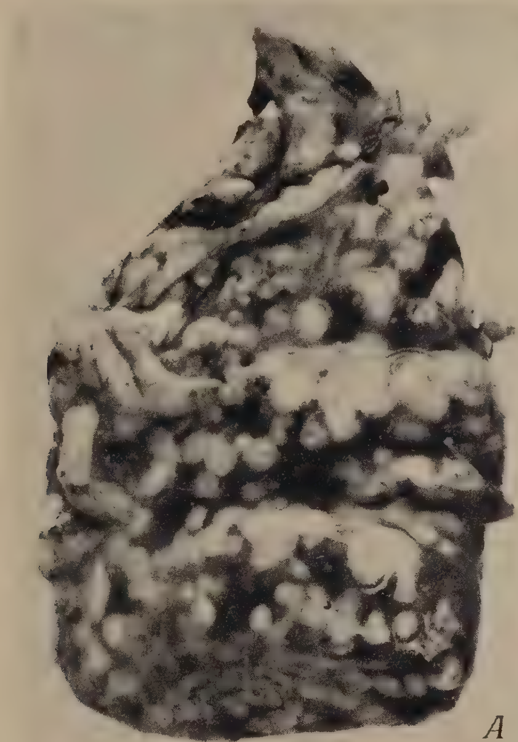

E


F

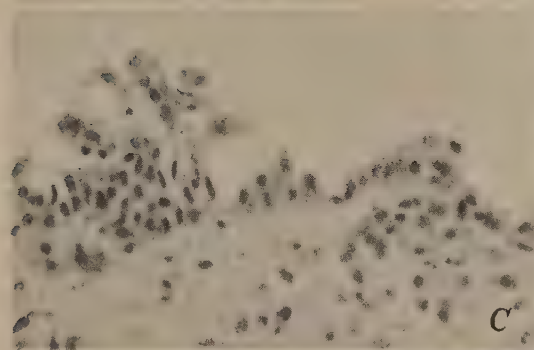
Arq. do Inst. Biologico, Vol. 11

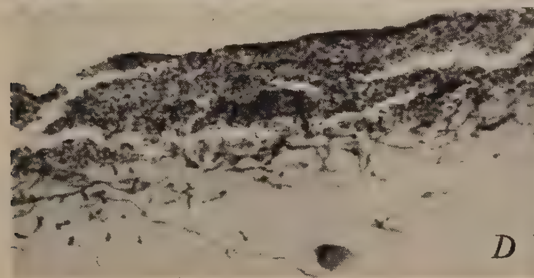
Estampa 63

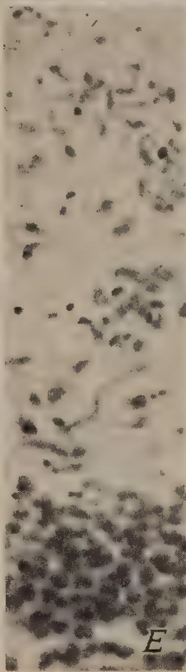



A


B

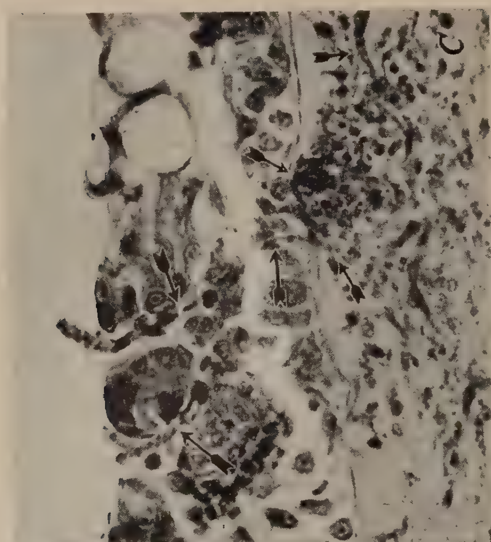

C

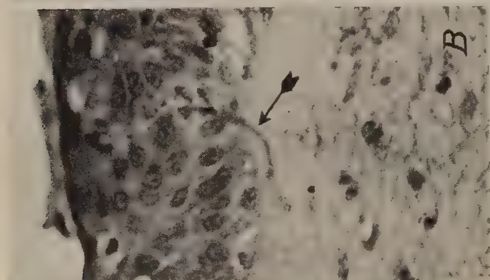

D


E


F

Estampa 65

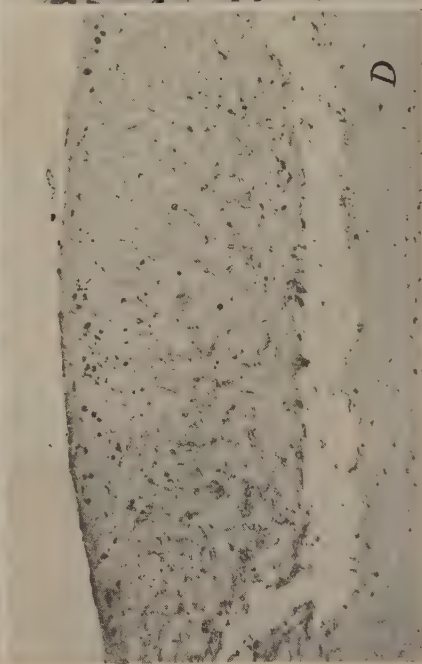


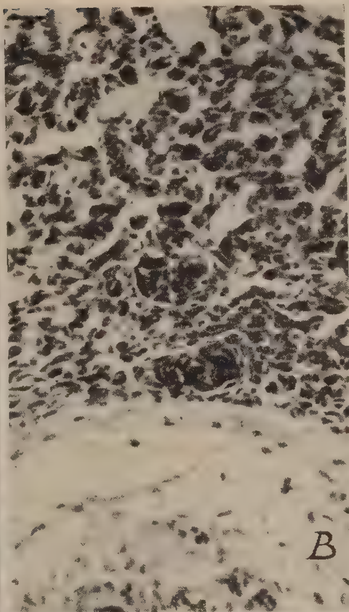


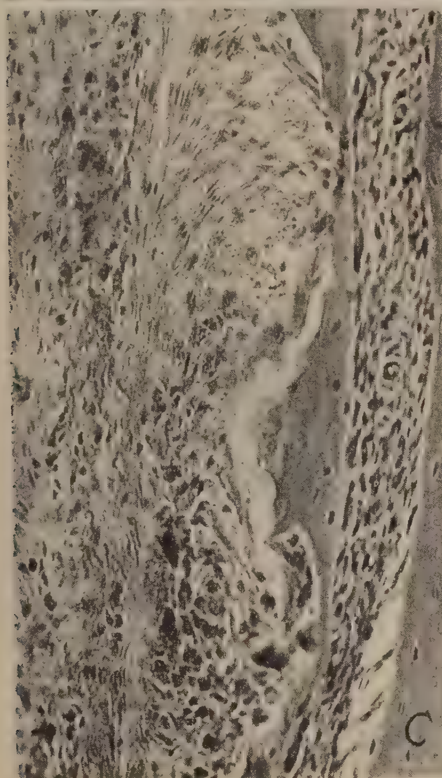


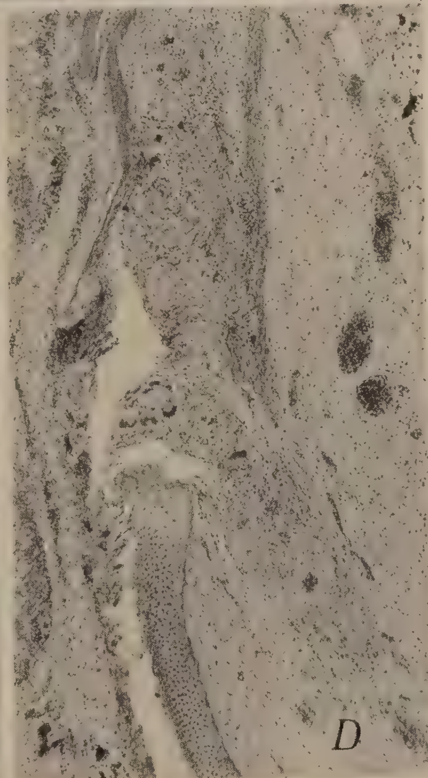


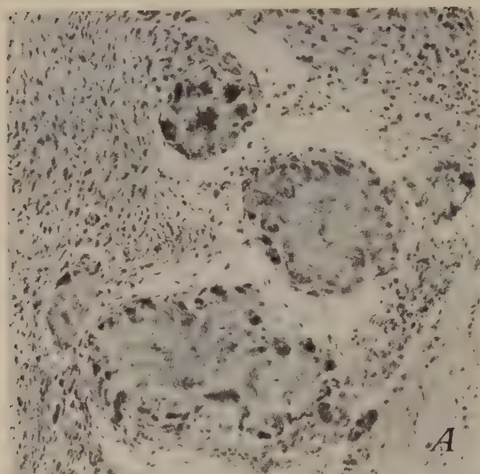

A


B


C

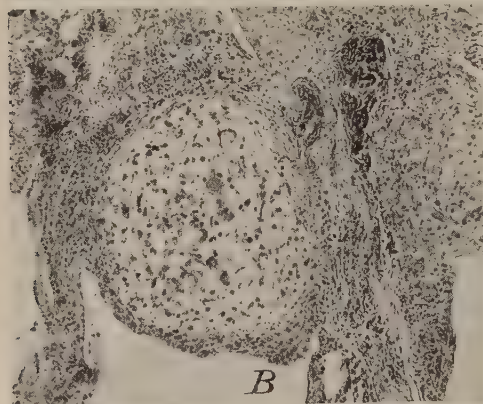

D

Estampa 67



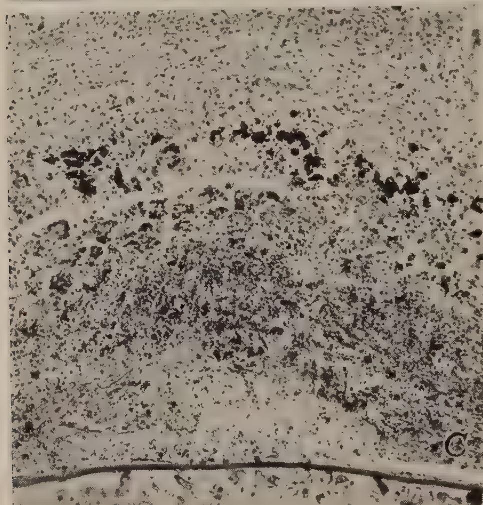


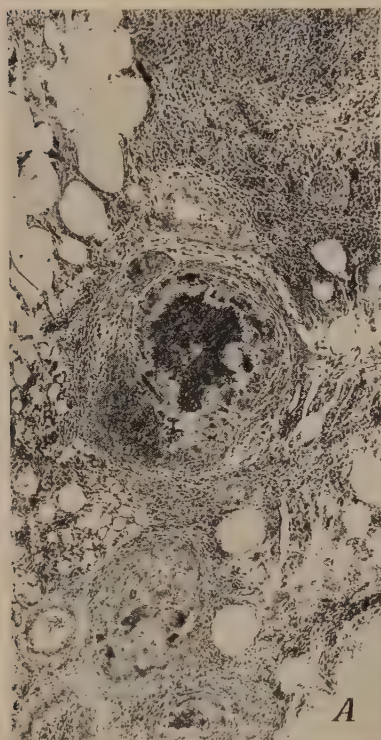


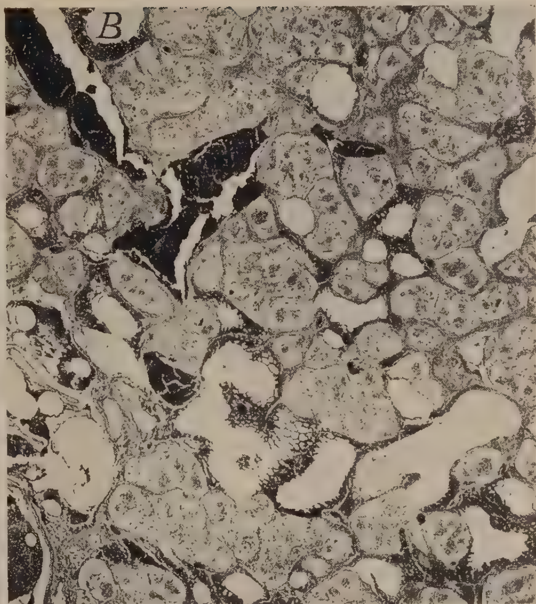


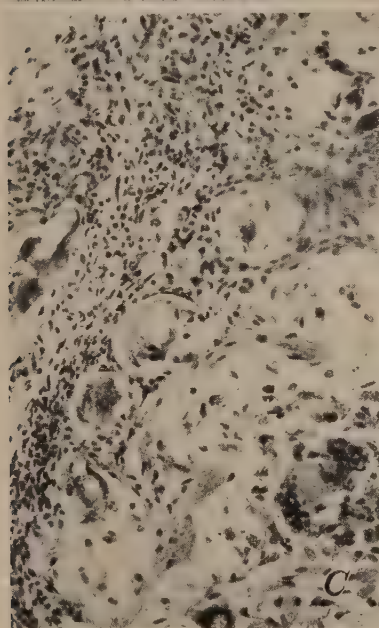


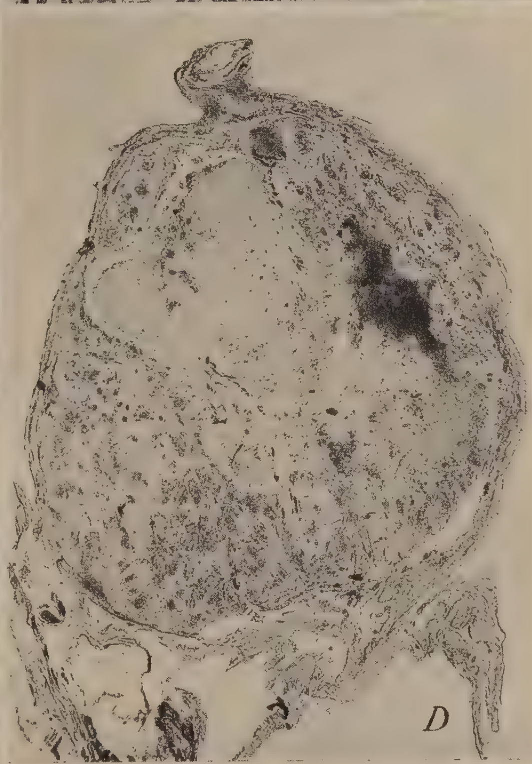




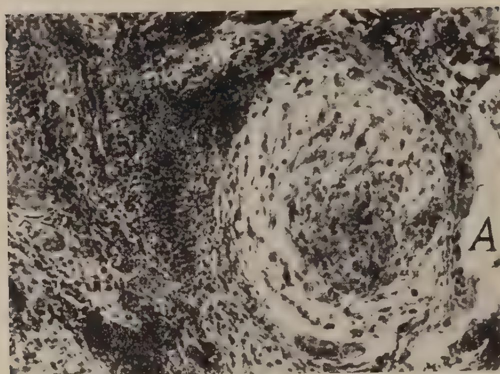

A

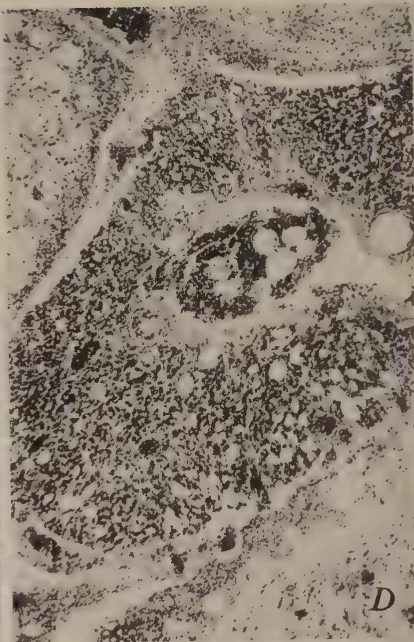

B

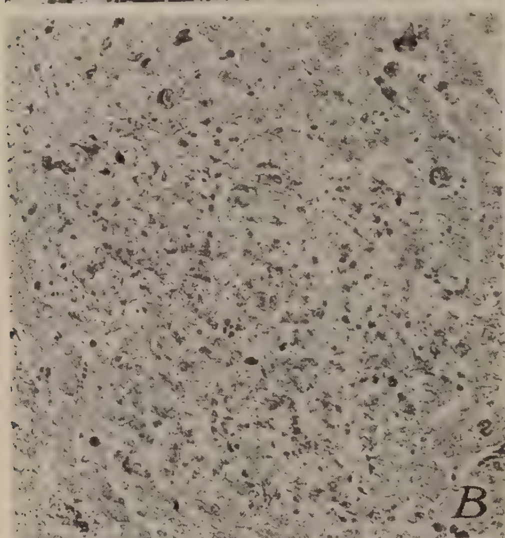

C

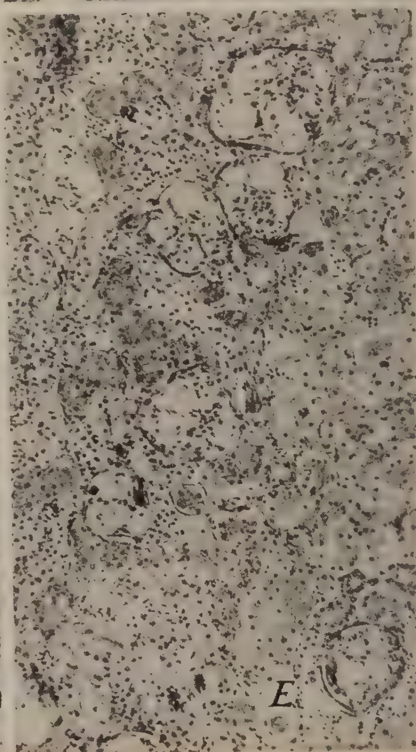

D

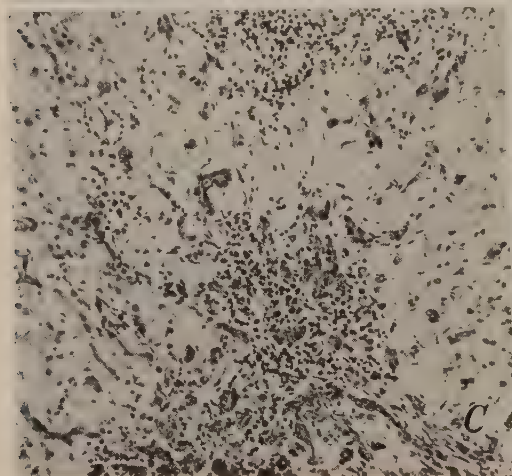
Estampa 69

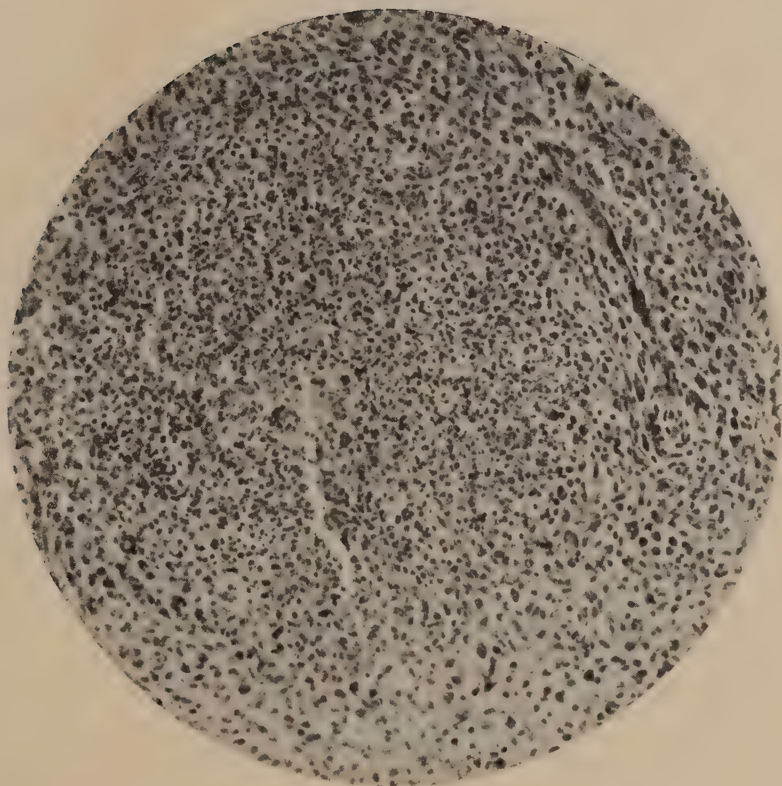


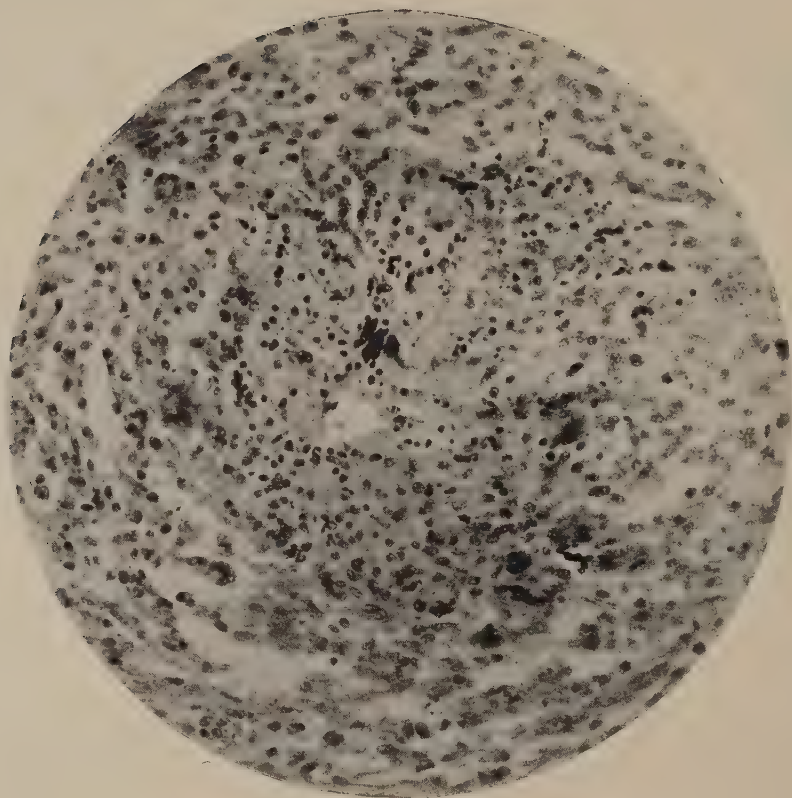



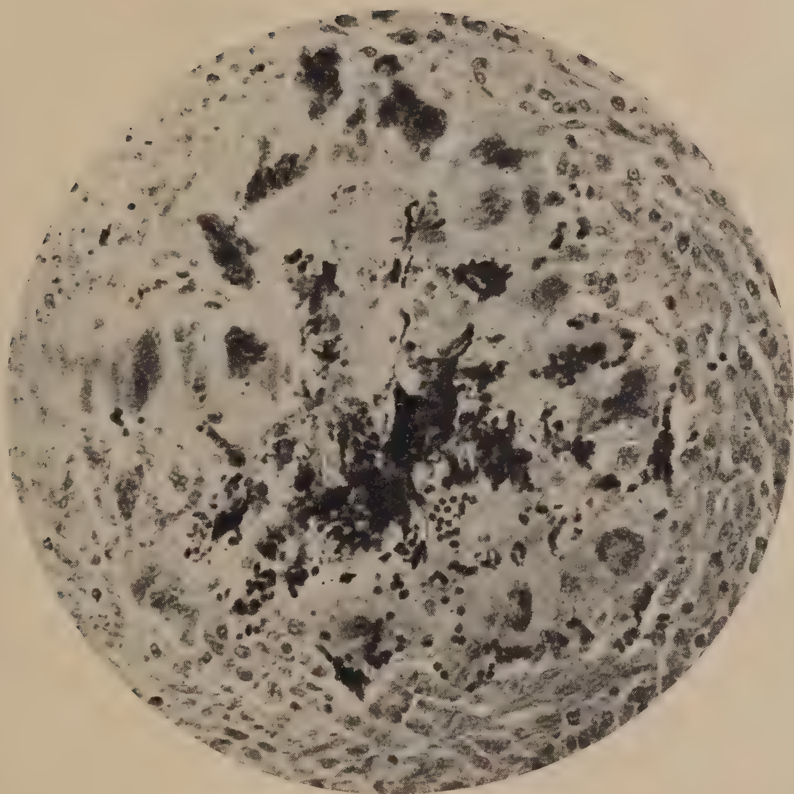



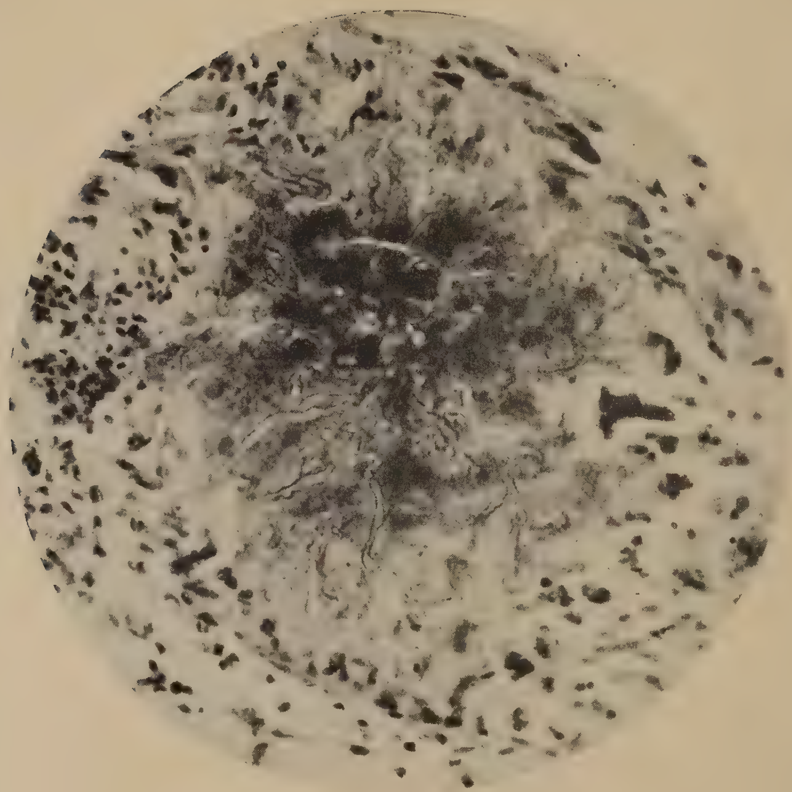











# RECENTES PROGRESSOS SOBRE A IMPORTANCIA DA HISTAMINA NOS FENOMENOS PATOLOGICOS

POR

M. Rocha e Silva

Do Instituto Biologico de S. Paulo

A importancia sempre crescente que adquire para toda a patologia, o problema da libertação de histamina nos tecidos vivos, justificaria por si só tratar-se desse assunto no livro jubilar de um anatomopatologista como o Prof. ROCHA LIMA. Além disso, alguns dos progressos de que trataremos a seguir, dos mais modestos certamente, foram realizados no proprio Instituto Biologico, sob o estimulo benefico da critica sempre construtiva do seu atual diretor, o que exige que a êles nos refiramos no seu livro jubilar.

## FENOMENOS NEUROHUMORAIS

Inspirados nos trabalhos classicos de LOEWI & Col. bem como nos de DALE & Col. que estabeleceram a natureza colinergica das excitações parasimpaticas, e de CANNON, BACQ e ROSENBLUTH, que estabeleceram a natureza adrenergica das excitações simpaticas, recentemente UNGAR & Col. introduziram a noção de filetes nervosos histaminergicos, que estariam situados nas raizes sensitivas dos nervos raqueanos. A questão em essencia não era nova, e a introdução de um termo por si só não implicaria nenhum progresso, se não viesse acompanhado de numerosas verificações experimentais que substanciaram definitivamente a noção. A vasodilatação antidromica já tinha aparecido a numerosos pesquisadores (GASKELL, 1916; BAYLISS, 1923; FREY, 1911 e muitos outros) como um fenomeno neurohumoral, em que a excitação nervosa mobilizasse certos metabolitos que agiriam em seguida sobre os pequenos vasos. Em 1924, LEWIS & Col. admitiram que a substancia em jogo na excitação antidromica fosse uma substancia-H, de propriedades similares ás da histamina. Sabe-se que esta concepção serve de base para uma explicação racional do fenomeno designado por TH. LEWIS como "triplice reação" e que seria desencadeado na pele humana sob a ação de diversos irritantes. Segundo LEWIS, esses irritantes (calor, picada de insétos, raios ultravioleta, antigeno nos individuos sensibilizados, etc.) produziriam uma descarga de substancia-H (a propria histamina, segundo DALE, 1929) na extremidade das terminações sensitivas, a qual excitaria por sua vez

essas terminações sensitivas e produziria uma vasodilatação antidromica por reflexo axonico. Essa teoria ficou desde logo assentada sobre fatos muito simples e indiscutiveis: de um lado, a degeneração dos nervos sensitivos impede a produção da reação triplice, por outro lado a cocainização da pele impede a produção da vasodilatação antidromica. Entretanto, a noção de uma histaminergia normal e patologica só ficou definitivamente estabelecida nos trabalhos recentes de UNGAR & Col., que em 1935 mostraram que a excitação da extremidade periférica de um nervo puramente sensitivo como o nervo safeno interno, determina abundante secreção gastrica (test sensivel de uma mobilização de histamina dos tecidos). Posteriormente UNGAR & Col. mostraram que tambem a excitação de nervos viscerais, contendo filetes originados das raizes posteriores de nervos raqueanos, é seguida de forte secreção de suco gastrico, como, por exemplo, a excitação da extremidade visceral do esplancnico ou do frenico, no cão atropinizado. Uma experiencia sugestiva de TINEL & UNGAR (1935) permite mostrar com muita clareza a relação entre esse fenomeno certamente de grande importancia para a fisiologia normal, com os fenomenos propriamente patologicos. Mergulhando na agua a 50° a pata posterior de um cão, puderam constatar um aumento nitido da secreção gastrica. O mesmo aquecimento entretanto, numa pata cujos nervos sensitivos degeneraram, não determina nenhum aumento de secreção gastrica. A idéa de que o fenomeno estivesse ligado a um reflexo interessando os centros nervosos superiores, pôde ser excluida, porquanto a simples secção (sem degeneração) da raiz sensitiva, na pata afetada, não inhibia o fenomeno. Foi ainda demonstrado por UNGAR & Col. (1935 - 1939) que a embolia experimental produzida em diversas visceras pela injeção, na arteria aferente, de suspensões finas de particulas solidas, conduz a uma excitação nitida da secreção gastrica. Por outro lado a excitação dos filetes sensitivos viscerais conduz a lesões parenquimatosas muito semelhantes às produzidas pela injeção de histamina. Efetivamente a injeção de dicloridrato de histamina na arteria pulmonar ou na veia jugular determina lesões hemorragicas que muito se assemelham às lesões hemorragicas que sucedem a uma embolia pulmonar (infarto hemorragico postembolico). Póde-se citar ainda o trabalho recente de DUQUESNE (1938) que mostrou que um fóco de infarto hemorragico se enriquece continuamente em histamina. FRUGONI (1930), WASSERMANN (1933) e SALMON (1935) invocam uma mediação histaminica na etiologia do edema pulmonar agudo, que teria origem numa excitação anormal dos seios carotidianos.

Esses poucos exemplos mostram a importancia de uma ação histaminergica na produção de estados patologicos graves, por forte excitação de filetes nervosos sensitivos (cutaneos ou viscerais). E' tão extensa a possibilidade de aplicações das noções relatadas acima, que certamente não haverá fenomeno patologico que não as implique de maneira mais ou menos profunda. Se entretanto o papel de uma mediação histaminica na patogenia das embolias viscerais ou cerebrais, nas infecções microbianas e nos diversos estados patologicos acima citados, é, até certo ponto, objeto de pura especulação, esse papel parece no momento mais provavel nos casos de reação inflamatoria aguda, em certos envenenamentos e no choque anafilatico em certas especies animais.

## O PAPEL DA HISTAMINA NA INFLAMAÇÃO

Mostramos recentemente (em companhia de O. BIER) a falta de bases experimentais para a admissão de um novo fator capaz de explicar a produção de um edema inflamatorio, o que foi tentado por MENKIN (1936-1938, em numerosas publicações). Segundo esse conhecido pesquisador da Universidade de Harvard, uma substancia, cristalina e nitrogenada, extraida dos exsudatos inflamatorios — a leucotaxina — seria por si só capaz de reproduzir as sequencias basicas da inflamação: aumento de permeabilidade capilar e migração leucocitaria. Mais recentemente, MENKIN (1938) desenvolveu a teoria de que, sob a ação de irritantes diversos, a leucotaxina seria mobilizada dos tecidos e produziria o desencadeamento da reação inflamatoria basica. Ora, a existencia dessa substancia nos tecidos nunca foi demonstrada, nem mesmo se demonstrou que fosse uma substancia quimicamente definivel. A identificação da "leucotaxina" por um test biologico nunca foi efetuada de maneira convincente, porquanto parece ser uma substancia biologicamente muda: não produz contração do intestino de cobaia (MENKIN, 1939), não produz quéda da pressão arterial (MENKIN & KADISH, 1938), não dá um test de Zimmermann positivo (MENKIN, 1938). A sua identificação e a tentativa de a isolar sob forma purificada repousa exclusivamente num test inespecifico: a injeção intradermica em coelhos, produzindo um acumulo local do azul tripan injetado na veia. Ora, uma reação positiva com esse test póde ser obtida com qualquer agente irritante, e a histamina em concentrações apropriadas é capaz de reproduzir um test positivo pouco mais ou menos identico. Por outro lado o fato de que a péle do coelho é muito rica em histamina (ROCHA E SILVA & BIER, 1938) mostra que o test utilizado por MENKIN é inadequado a demonstrar a propriedade capilar-ativa da sua substancia, porquanto uma libertação de his-

tamina sob a ação da "leucotaxina" explicaria o test positivo com o azul tripan. O que MENKIN demonstrou, em rigor, foi que a sua substancia é um irritante local, provavelmente exercendo uma ação deleteria sobre as celulas da péle. Em favor desta interpretação póde-se citar as proprias experiencias recentemente publicadas por MENKIN (1939) segundo as quais a "leucotaxina" tem um efeito deleterio sobre os ovos de ouriço, diminuindo-lhes a vitalidade.

Insistimos repetidamente (1938-39) na necessidade de se substanciar a hipótese da existencia de uma nova substancia que pudesse desempenhar o papel da histamina nas suas reações conhecidas, por meio de tests diretos como os que foram realizados para esta ultima por DALE & RICHARDS (1918). Recentemente MITCHELL (1938) procurou explicar a lenta difusão do eritêma produzido pela irradiação ultravioleta, fazendo reviver de certo modo a primitiva concepção de KROGH (1929), da existencia de uma substancia macromolecular (colloide-H) de propriedades semelhantes ás da histamina. Tendo verificado um desdobramento de proteinas sob a ação das irradiações ultravioleta (MITCHELL & RIDEAL, 1938), MITCHELL admitiu que as substancias responsaveis pelo eritêma e pelo aumento de permeabilidade capilar fossem proteoses capazes de produzir efeitos semelhantes aos da histamina sobre os capilares e arteriolas. Recentemente (1939) propuzemos uma explicação para essa lenta difusão, admitindo que tais proteoses libertam histamina á medida que difundem. Assim, a lenta propagação do eritêma produzido pela irradiação estaria realmente ligada á lenta difusão de proteoses de alto peso molecular; mas o eritêma mesmo seria ainda produzido pela histamina libertada dos tecidos por tais produtos de desdobramento das proteinas. Em comunicação pessoal, assim se exprimiu MITCHELL: "*I think that your suggestion that the proteoses formed photochemically liberate histamine in the skin is probably right. It seems to me that the experiments of Török pointing to an immediate production on ultra-violet irradiation of human skin of an active substance of high diffusibility, do provide confirmatory evidence*". Certamente é indispensavel demonstrar, por um test direto, como a perfusão do pulmão de cobaia, que tais proteoses libertam histamina dos tecidos, como demonstrámos recentemente com os exsudatos inflamatorios.

Procuramos rapidamente esboçar em que consiste a luta atual entre os que, ortodoxamente, se filiam à teoria classica de TH. LEWIS, e os que procuram destrui-la sem fatos realmente substanciais. Não se deve ver nisso nem calvinismo nem espirito revolucionario, mas apenas a natureza movediça de um terreno que ainda não se consolidou

completamente. Se tentarmos colocar num dos pratos, os fatos favoraveis à teoria histaminica e no outro as magras evidencias favoraveis à existencia de substancias hipoteticas, pelo menos no momento a balança penderá para o lado da primeira.

## A TEORIA HISTAMINICA DO CHOQUE ANAFILATICO

E' compreensivel o papel que desempenha no desenvolvimento de um ramo cientifico a descoberta de uma técnica precisa ou de um test sensivel. No caso considerado, a melhora da técnica da extração da histamina dos liquidos e tecidos organicos, realizada por BARSOUM & GADDUM (1935) e por CODE (1937), determinou um grande surto de trabalhos e um melhor conhecimento da verdadeira distribuição da histamina nos tecidos das diferentes especies animais. Recentemente (1939) introduzimos uma modificação no metodo de CODE, o que permitiu uma grande redução do volume total de fluido a ser testado sobre o intestino de cobaia, redução particularmente apropriada à dosagem de histamina contida em grandes volumes de liquido de perfusatos de orgãos. Mais recentemente ainda ANREP & Col. (1939) introduziram nova alteração no metodo de BARSOUM & GADDUM, aumentando o numero de extrações pelo alcool do residuo secado no vacuo. Póde-se adiantar que os metodos biologicos citados chegaram a um gráo de grande precisão, incomparavelmente superior aos dos mais sensiveis metodos quimicos.

Tais metodos permitiram atacar de maneira direta a questão sempre discutida, do papel que a histamina poderia ter na gênese dos sintomas do choque anafilatico. Dosagens de histamina no sangue de cobaias sensibilizadas, antes e depois da injeção do antigeno, realizadas recentemente por CODE (1939), mostraram um nitido aumento, por si só suficiente para explicar o choque nessa especie animal. SCHILD (1939) utilizou uma técnica muito elegante para demonstrar a libertação de histamina sob a ação do antigeno nos tecidos de um animal sensibilizado. Pequenos fragmentos de tecidos de cobaias sensibilizadas eram postos em contacto com o antigeno, *in vitro*, e a difusão da histamina para o liquido ambiente era testada sobre ileo de cobaia. Pôde demonstrar que os tecidos (particularmente a aorta) libertam histamina quando postos em contacto com o antigeno. Dessa maneira ficou definitivamente assentado o papel da histamina na produção do choque naquela especie animal. Esse resultado definitivo é comparavel ao que já tinha sido obtido para o cão por DRAGSTEDT & Col. (1932), que mostraram que nos linfaticos eferentes do figado de um cão em choque anafilatico aparece uma substancia hipotensora e excitante da

musculatura lisa e especificamente destruida pela histaminase. Para as outras especies animais, entretanto, a teoria histaminica está longe de ter recebido tais comprovações diretas. CODE (1939) mostrou recentemente em bovinos anafilatizados, que o conteúdo de histamina do plasma não aumenta, e em alguns casos diminue, depois da injeção do antigeno. No coelho, a questão é mais complexa e está ainda no dominio das evidencias indiretas. Realmente a injeção de histamina em pequenas doses em coelhos determina ordinariamente uma elevação rapida da pressão carotidiana e em seguida uma quéda evanescente, ao passo que a injeção do antigeno no coelho sensibilizado determina sempre uma quéda, às vezes mortal, da pressão sanguinea (ARTHUS, 1909; AUER, 1911; SCOTT, 1910 e muitos outros). Foi verificado que a ação da histamina nesta especie animal depende da anestesía utilizada, sendo mesmo observado por FELDBERG (1927) que sob anestesía pela cloralose o coelho reage à histamina com uma quéda nitida da pressão carotidiana. Os efeitos da histamina nesta espécie animal parecem depender do balanço de duas ações, uma vasopressora nas grandes arterias e outra vasodepressora nos capilares e vênulas. Aparentemente o que precisava ser demonstrado, no choque anafilatico do coelho era a existencia de um efeito vasopressor pela injeção do antigeno, porquanto pelas condições de técnica e de local de libertação da histamina dos tecidos, só tinha sido observado até então o efeito vasodepressor da injeção do antigeno no animal sensibilizado. Mostrámos recentemente (1940) que é possivel, por um tratamento mecanico (constricções e relaxamentos sucessivos da arteria pulmonar), produzir um estado permanente de baixa pressão arterial no coelho e por esse meio salientar enormemente aquele efeito vasopressor da histamina, que passa a ser mesmo o unico observavel. Interpretámos esse fato como consequente á exclusão completa do tonus dos pequenos vasos, que deixariam de reagir à ação vasodilatadora da droga. Essa preparação pareceu-nos muito apropriada para acentuar o eventual efeito vasopressor do antigeno no coelho sensibilizado. Com efeito a injeção do antigeno num coelho sensibilizado e tratado pela técnica acima indicada, foi seguida de forte elevação da pressão carotidiana. A semelhança dos efeitos produzidos pela injeção da histamina e do antigeno no coelho sensibilizado, tornou-se assim mais aparente.

## O PROBLEMA GERAL DA LIBERTAÇÃO DE HISTAMINA DOS TECIDOS

O mecanismo da libertação de histamina dos tecidos vivos ainda não foi completamente esclarecido. LEWIS & Col. admitiram

que uma descarga de substancias semelhantes à histamina poderia ser uma primeira reação de defeza da celula contra um agente deleterio qualquer. A identificação dessas substancias-H à propria histamina dos tecidos encontrou, de inicio, dificuldades sérias. Assim KROGH (1929), embora concordando com a hipótese de LEWIS, admite a possibilidade de duas substancias, uma rapidamente difusivel e que seria a propria histamina, e outra dificilmente difusivel e que designou como coloide-H. Segundo DALE (1929) entretanto, a substancia-H de LEWIS ou o coloide-H de KROGH estariam ambos incluidos num grupo de combinações moleculares frouxas, de onde a histamina póde ser libertada desde que a celula seja agredida por um agente deleterio qualquer.

O mecanismo pelo qual essas ligações frouxas da histamina com as substancias tissulares são desfeitas, é de suma importancia para a compreensão dos fenomenos patologicos acima referidos. Isso explica a preocupação constante de numerosos pesquisadores, como FELDBERG & Col. (1937 e 1938), KELLAWAY & Col. (1938), GARAN (1938), BACHMANN (1938), UNGAR & Col. (1939) e tantos outros, de esclarecerem exatamente a natureza das substancias que são capazes de libertar histamina dos tecidos vivos. As experiencias dos autores citados foram entretanto orientadas no sentido de pesquisar o efeito de diversos agentes deleterios, como veneno de cobra, veneno de abelha, toxinas bacterianas, peptona, $HgCl_2$, gazes toxicos, etc., todos eles extranhos ao organismo dos mamiferos. Recentemente (1938-40) mostrámos que a tripsina, sob muitos aspectos, se assemelha aos venenos animais do tipo do veneno de cobra, de escorpião e de abelha. Alguns miligramos de tripsina cristalina injetados na veia de um gato ou de um coelho determinam uma quéda consideravel e mesmo mortal da pressão carotidiana, acompanhada de nitido espasmo na circulação pulmonar. No cão o mesmo efeito fortemente hipotensor foi observado, cabendo ao figado papel principal na gênese dessa reação à tripsina. Por outro lado as reações de musculos lisos, como intestino e utero de cobaia, sugerem fortemente a mediação de uma substancia ativa libertada dos tecidos sob a ação do fermento proteolitico. Em particular o fenomeno por nós observado, da dessensibilização do musculo liso às pequenas doses de tripsina, em tudo semelhante ao que se observa com os venenos de cobra e de abelha e choque anafilatico *in vitro*, sugere a participação de uma substancia tissular. Experiencias de perfusão do pulmão de cobaias com soluções de tripsina, mostraram a capacidade desta ultima, de libertar histamina dos tecidos,

o que forneceu a base para uma explicação dos seus efeitos hipotensor e excitante da musculatura lisa do intestino e utero das diversas especies animais. Admitimos que a libertação de histamina dos tecidos sob a ação da tripsina deve ser mesmo um primeiro degrão no desdobramento das proteinas tissulares, dada a subitaneidade de muitos dos seus efeitos farmacologicos. Não é impossivel, em vista da ação corrosiva da tripsina (RICH & DUFF, 1936; BOLDYREFF, 1938) que essa descarga pronta de histamina seja simplesmente a manifestação do mecanismo de defeza postulado por LEWIS & Col. (1927). De qualquer maneira acreditamos que todos esses fatos pódem trazer uma contribuição ao conhecimento do mecanismo intimo da reação:

histamina ligada → histamina livre

de capital importancia para a compreensão dos processos morbidos que foram sumariamente referidos acima.

Em trabalho recente (1940), RAMIREZ DE ARELLANO, LAWTON & DRAGSTEDT confirmaram os nossos resultados sobre a libertação de histamina do pulmão de cobaia perfundido com soluções de tripsina e mostraram que a tripsina injetada em cães produz um aumento nitido do conteúdo histaminico do sangue, de algum modo correlato á gravidade dos efeitos toxicos desencadeados pelo enzima. Mostraram ainda que cerca de 33 $\gamma$ de histamina são libertadas de cada grama de figado, pela injeção, em cães, de um preparado de tripsina.

## CONCLUSÃO

Não deixa de ser um desafio á imaginação o fato de que uma substancia primeiramente sintetizada por WINDAUS & VOGT em 1907, como simples curiosidade quimica, em seguida obtida como produto de decomposição bacteriana da histidina (ACKERMANN, 1910) e encontrada por BARGER & DALE (1910) num fungo venenoso como o "*Claviceps purpurea*", assuma sucessivamente uma importancia crescente, dadas as suas propriedades farmacologicas importantes (DALE & LAIDLAW, 1910 e 1911; POPIELSKI, 1918) e o fato de ocorrer nos tecidos vivos (BEST, DALE, DUDDLEY & THORPE, 1927), adquirindo um carater de agente de grande significação na maioria dos processos morbidos. Este fato poderia por si só constituir exemplo para ilustrar o valor que póde assumir no futuro uma pesquiza cientifica desinteressada. A natureza fornece inicialmente, e de cada vez, pequenos indicios, migalhas que por si mesmos nada valem, mas que bem considerados pódem abrir o caminho para a solução dos grandes problemas teoricos e praticos.

RECENT ADVANCES IN THE IMPORTANCE OF HISTAMINE ON PATHOLOGICAL PHENOMENA

*A b s t r a c t*

*Some recent advances, including those introduced by the author, in the study of histamine related to pathological phenomena are discussed in the present paper. Particularly the rôle played by histamine in acute inflammation and anaphylactic shock, as well as the general problem of histamine liberation have been considered.*

BIBLIOGRAFIA

ANREP, G. V. & COL. — *Journ. of Physiol.* 95, 476 (1939).
BARSOUM, G. S. & J. H. GADDUM — *Journ. of Physiol.* 85, 1 (1935).
BIER, O. & M. ROCHA e SILVA — *Arq. Inst. Biol.* 9, 109 (1938).
BIER, O. & M. ROCHA E SILVA — *Virchow's Arch.* 303, 325 (1939).
BACHMANN, H. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 190, 345 (1938).
BOLDYREFF, W. N. — *Erg. inn. Med. u. Kinderheil.* 54, 333 (1938).
CODE, C. F. — *Journ. of Physiol.* 89, 257 (1937).
CODE, C. F. — *Am. Journ. of Physiol.* 123, 40 (1938).
CODE, C. F. — *Am. Journ. of Physiol.* 127, 71 (1939).
DALE, H. H. — *The Lancet.* 216, 1232 (1929).
DRAGSTEDT, C. A. & E. GEBAUER-FUELNEGG — *Am. Journ. of Physiol.* 102, 512 (1932).
DUQUESNE, H. — *Arch. Intern. de Physiol.* 48, 123 (1938).
FELDBERG, W. — *Journ. of Physiol.* 63, 211 (1927).
FELDBERG, W. & W. J. O' CONNOR — *Journ. of Physiol.* 90, 288 (1937).
FELDBERG, W. & C. H. KELLAWAY — *Journ. of Physiol.* 90, 257 (1937).
FELDBERG, W. & C. H. KELLAWAY — *Aust. Journ. of exp. Biol. and Med. Sc.* 15, 461 (1937).
FELDBERG, W. & C. H. KELLAWAY — *Journ. of Physiol.* 94, 187 (1938).
GARAN, R. S. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 188, 250 (1938).
KELLAWAY, C. H., H. F. HOLDEN & E. R. TRETHEWIE — *Aust. Journ. of exp. Biol. and Med. Sc.* *16*, 331 (1938).
KROGH, A. — Anatomy and Physiol. of the Capillaries. 2nd Edit. New Haven. 1929.
MENKIN, V. — *Proc. of the Soc. f. exp. Biol. and Med.* 36, 164 (1937).
MENKIN, V. — *Journ. of. exp. Med.* 67, 129 (1938).
MENKIN, V. — *Journ. of exp. Med.* 67, 145 (1938).
MENKIN, V. — *Physiol. Rev.* 18, 366 (1938).
MENKIN, V. — *Biol. Bull.* 77, 335 (1939).
MENKIN, V. & M. KADISH — *Am. Journ. of Physiol.* 124, 524 (1938).
MITCHELL, J. S. — *Proc. of the Royal Soc.* B. 126, 241 (1938).
MITCHELL, J. S. & E. K. RIDEAL — *Proc. of the Royal Soc.* A. 167, 342 (1938).
RAMIREZ DE ARELLANO, M., A. H. LAWTON AND C. A. DRAGSTEDT. — *Proc. of the f. exp. Biol. and Med.* 43, 360 (1940).
RICH, A. R. & L. DUFF — *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 58, 212 (1936).
ROCHA E SILVA, M. — *Arq. Inst. Biol.* 9, 145 (1938).
ROCHA E SILVA, M. — *Arq. Inst. Biol.* 10, 93 (1939).
ROCHA E SILVA, M. — *Compt. Rend. Soc. Biol.* 130, 181-184-186 (1939).
ROCHA E SILVA, M. — *Nature*, 144, 152 (1939).

ROCHA E SILVA, M. — *Fol. Clin. et Biol.* 11, 70 (1939).
ROCHA E SILVA, M. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 194, 335 (1940).
ROCHA E SILVA, M. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* 194, 351 (1940).
ROCHA E SILVA, M. — *Nature,* 145, 591 (1940).
ROCHA E SILVA, M. — *Journ. of Immunol.* 38, 333 (1940).
ROCHA E SILVA, M. & O. BIER — *Arq. Inst. Biol.* 10, 219 (1939).
ROCHA E SILVA, M. & O. BIER — *Virchow's Arch.* 303, 337 (1939).
SCHILD, H. O. — *Journ. of Physiol.* 95, 393 (1939).
TINEL, J., G. UNGAR & A. GROSSIORD — *Compt. Rend. Soc. Biol.* 119, 702 (1935).
UNGAR, G., X. J. CONTIADES & G. PALMER — *Compt. Rend. Soc. Biol.* 120, 326 (1935).
UNGAR, G., A. GROSSIORD & J. BRINCOURT — *Compt. Rend. Soc. Biol.* 120, 632 (1935).
UNGAR, G. & A. UNGAR — *Compt. Rend. Soc. Biol.* 130, 1446 (1939).
UNGAR, G. — Les Substances Histaminiques et la transmission chimique de l'influx nerveux. Hermann & Cie. Edit. Paris (1937).

——o——

# FOTOSENSIBILIZAÇÃO EM BOVINOS
## A "PESTE DAS QUEIMADAS", DOENÇA CAUSADA PELO "HOLOCALYX GLAZIOVII, TAUB."

POR

M. Rocha e Silva

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 74-89

Desde 1933 impressionante mortandade de bovinos vinha sendo assinalada na Fazenda Guanabara, no extremo noroeste do Estado de São Paulo.

Os caracteristicos mais acentuados da doença têm consistido no seguinte: 1.°) Aparece de preferencia nos pastos recentes, de 1, 2 ou 3 anos no maximo. A repetição anual da queimada determina a extinção da doença ao fim de 3 a 4 anos. 2.°) Na fase aguda, inicial, os animais apresentam sinais de grande irritação, edemas mais ou menos pronunciados por todo o tecido subcutaneo, sobretudo na barbela, orelhas, palpebras, axilas e virilhas. Durante essa fase aguda, a febre foi constatada algumas vezes. 3.°) Passada a fase aguda os edemas diminuem ou sécam completamente dando lugar a lesões necroticas mais ou menos intensas da péle. 4.°) De acordo com o que constatamos, tais lesões necroticas aparecem de preferencia nas partes claras e mais expostas da péle: orelhas, barbela, partes laterais do tronco, ou nas partes visivelmente mais delgadas e glabras da péle, como axila e virilhas e parte posterior das pernas. As partes ventrais são geralmente poupadas. Frequentemente, sobretudo no animal muito claro, toda a parte lateral do tronco póde apresentar-se sêca ou quebradiça. 5.°) A autopsia revela geralmente intensa ictericia, hemorragias graves do tecido subcutaneo, do peritonio e pericardio, bem como espessamento acentuado da bile, que se mostra semisolida, avermelhada, com o especto de geléa de morango. 6.°) Ao exame microscopico, o figado apresenta grande acúmulo de gordura e sinais evidentes de degeneração das celulas parenquimatosas (1).

A possibilidade de se explicar o quadro morbido pela ação de agentes infecciosos microbianos pôde ser excluida pelos exames detalhados, microscopicos e bacteriologicos, realizados pelos Drs. J. R. MEYER, A. M. PENHA, J. MOREIRA e P. BUENO, todos com resultados negativos. Inoculações de sangue de um animal doente em um são, bem

(1) Póde ser lembrado aqui que num dos primeiros anos da fazenda Guanabara, de 3.000 bois sacrificados no matadouro de São Paulo e daquela proveniencia, apenas 1% dos figados puderam ser aproveitados (fato relatado pelo Snr. A. Moura Andrade).

como numerosas inoculações de maceratos de órgãos nos animais de laboratorio, foram realizados repetidamente durante os 4 ou 5 anos em que a doença foi investigada pelos técnicos do Instituto Biologico, sempre com resultados negativos. A idéa de uma planta toxica foi então aventada e uma comissão de botanicos, chefiada pelo Dr. F. C. HOEHNE, esteve no local, investigando sobretudo a possibilidade de certos parasitas do capim Jaraguá ou Colonião poderem explicar a mortifera doença. Os resultados a que chegou aquele conhecido botanico estão referidos no recente livro publicado pelo Departamento de Botanica do Estado, "Tratado de Plantas toxicas e medicinais". Vem aí indicado que no capim de certos pastos da Fazenda Guanabara foi encontrado *Claviceps*, ao qual é atribuida a causa da doença. O material colhido na fazenda e classificado pelo Dr. DRUMMOND MARTINS era entretanto um fungo, *Cerebella andropogonis*, parasita possivel do *Claviceps*. O *Claviceps* mesmo não foi encontrado. O Dr. HOEHNE admite que o responsavel pelo surto epizootico seja efectivamente o *Claviceps*, baseando-se na suposição de que, se existe um possivel parasita do *Claviceps*, este ultimo deve existir livre nos pastos em que não exista *Cerebella andropogonis*.

Por dois motivos parecem-nos inconsistentes as conclusões do Dr. F. C. HOEHNE: 1.°) A doença aparece nos pastos novos, recentemente queimados, onde o capim é escasso ou sêco. Depois das grandes chuvas do fim da primavera, quando o capim brota intensamente, a doença se extingue. 2.°) A localização das lesões da péle póde excluir de maneira categórica um envenenamento pelo *Claviceps purpurea*. Realmente o "ergotinismo", quadro de envenenamento cronico pelos alcaloides encontrados naquele fungo, é caracterizado pela necrose das extremidades, talvez em virtude de uma ação espasmodica exercida sobre as arterias terminais. Está claro que um envenenamento muito acentuado poderia produzir lesões de localização atípica, o que só se verificaria, entretanto, depois de se produzirem graves lesões necroticas nas extremidades das patas, orelhas, cauda, focinho, etc. Ora, nunca observamos nos animais doentes da Fazenda Guanabara, o menor vestigio de uma necrose da cauda, do focinho ou das patas, embora tenhamos constatado lesões muito graves localizadas nas partes laterais do tronco e face posterior das pernas.

A sintomatologia externa da doença, sugere fortemente a participação de um fator externo, e a localização das lesões nas partes mais claras e glabras da péle levou-nos a pensar no sol, como sendo o fator externo. A semelhança com certas doenças conhecidas na Europa, como Fagopyrismo e Hypericismo, ou na Africa do Sul, como Tribulose ovina, em cuja etiologia desempenha impor-

tante papel a ingestão de certas plantas como *Polygonum fagopyrum, Hypericum crispum* e *Tribulus terrestris* que tornam o animal sensivel á luz, levou-nos a admitir que tambem no caso da "Peste das queimadas" se tratasse de uma planta existente exclusivamente nos pastos recentemente formados e que, ingerida pelos animais, produzisse fenomenos de foto-sensibilização.

## ÉPOCA DO ANO E CONDIÇÕES EXTERNAS EM QUE A DOENÇA APARECE

Graças á gentileza do Snr. Antonio de Moura Andrade, proprietario da Fazenda Guanabara, pudemos realizar, *in loco,* observações demoradas, das condições em que se produz a doença. Foi nosso objetivo, durante duas estadias na fazenda, inspecionar o local em que se desencadeara esse ano um pequeno surto da doença. Estivemos pela primeira vez nos dias 17 a 19 de Outubro de 1939, em companhia do Prof. F. RAWITSCHER, da Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras, que muito nos ajudou para excluir a possibilidade de atribuirem-se os casos de morte de animais da fazenda a plantas sabidamente fotosensibilisantes, como *Hypericum, Polygonum fagopyrum* ou *Tribulus terrestis.* Na inspeção demorada que fizemos em pasto de 10 alqueires, onde foram observados numerosos casos da doença, não encontramos nenhum exemplar daquelas plantas. Algumas especies do genero *Polygonum* foram encontradas, mas nada tinham de peculiar ao pasto em apreço.

Uma segunda estadia mais demorada na fazenda Guanabara, de 5 a 19 de Novembro de 1939, permitiu um estudo demorado da distribuição das plantas que tinhamos trazido da viagem anterior e cujo estudo toxicológico estava já terminado. Nessas duas viagens colhemos material de informação e de observação suficiente para se ter uma visão clara e precisa da situação.

A época em que aparece a doença pode ser precisada da seguinte maneira: Os primeiros casos são observados 7 a 15 dias depois da primeira chuva do fim do inverno e começo da primavera. Em 1939, por exemplo, essa primeira chuva tardou muito (aprox. em 4 de Outubro), e os primeiros casos apareceram em grande numero depois do dia 10 de Outubro, num pasto recentissimo, queimado pela primeira vez nesse ano. Nos pastos de 2 a 5 anos apareceram casos esporadicos, no fim de Outubro. Ordinariamente, depois das chuvas fortes que sobrevêm no fim da primavera, a doença se extingue. As fotografias da Est. 73 esclarecem a questão. Foram ambas tiradas no mesmo local; uma, a fig. A, no dia 18 de Outubro, quando os primeiros casos da doença tinham sido observados, outra, fig. B, em 16 de Novembro, depois das grandes chuvas e quando a doença praticamente tinha terminado. O capim adqui-

rira então um desenvolvimento enorme, cobrindo completamente toda a vegetação daninha, bem como os tócos de arvores que tinham brotado no mês anterior.

A queimada é feita todo ano durante as sêcas de inverno (de Julho a Setembro). Depois da queimada o espectro da região é bem tipico. O campo, quasi completamente livre de plantas verdes, apresenta, de espaço a espaço, tócos de arvores chamuscados pelo fogo (Est. 75, fig. C). Depois da primeira chuva fraca do fim do inverno ou começo da primavera os tócos das arvores começam a brotar intensamente (Est. 75, fig. D), sendo nesse momento o unico material verde á disposição do gado. O capim plantado então, ou que sobreviveu á queimada, é ainda muito pequeno ou completamente sêco (Est. 74, fig. A). Em demoradas visitas aos pastos, verificamos que são essas as condições externas que condicionam a doença. Todos os casos por nós estudados podiam ser postos em relação com campos que sofreram a queimada.

## SINTOMAS EXTERNOS

Pelos dados colhidos de informações diversas, muitas vezes contraditorias, é muito dificil fazer uma resenha de todos os sintomas da doença. Algumas informações entretanto são dignas de todo o credito. Póde-se admitir como certo que o boi, quando aparece doente, dá mostras de grande agitação, abana a cabeça, afasta-se do rebanho, investe para as pessôas. Em outras fases da doença (fase final) entretanto, é frequente mostrar-se apático, com a cabeça baixa, imovel. E' citado o caso de um animal encontrado á beira da estrada completamente imovel. Procurando assusta-lo, o automovel foi dirigido contra êle, que se manteve imovel, indiferente. Quarenta minutos depois foi encontrado morto no mesmo lugar.

Um dos animais (caso n.º 1), observado por nós, foi submetido a certo numero de provas, antes de ser sacrificado para a autopsia. Tratava-se de um caso já no periodo de séca, apresentando lesões cutaneas localizadas nas partes posteriores da perna e nas axilas. Mostrou sinais típicos de fotosensibilização: trazido para o sol mostrava respiração ofegante, forte dispnéa (130 por minuto); levado para a sombra, rapidamente os sinais de dispnéa desapareciam. Esse animal apresentava ainda sinais evidentes de fotofobia (com blefaroespasmo) quando mantido ao sol. Esses sintomas de fotosensibilização, combinados com a localização das lesões nas partes claras e mais finas da péle, mostraram de maneira muito nitida a importancia do fator externo (luz do sol) na produção da doença (Est. 76).

A localização das lesões nas partes claras foi um fato constantemente constatado por nós. Inspecionando uma fotografia antiga da coleção do Dr. J. MOREIRA, esse fato aparece com grande nitidez, como póde ser visto na fig. G (Est. 77). Tratava-se de um boi escuro com manchas claras localizadas na barbela, na axila, nas faces laterais e quasi glabras, das pernas. Sobre essas manchas, extensas lesões necroticas da péle pódem ser observadas.

E' indiscutivel a ocorrencia de edemas da barbela, das orelhas, das axilas, na fase aguda da doença. A fig. H (Est. 77), tirada pelo Dr. J. MOREIRA, em 1936, mostra essa distribuição do edema nas partes anteriores do animal. Não é impossivel que um extenso edema subcutaneo seja mesmo a regra. As informações colhidas referem-se sempre a um a u m e n t o d e v o l u m e do animal, por espessamento do dorso. Mas é fóra de duvida que os volumosos edemas como os da fig. H, não constituem a regra. Na ano de 1939, por exemplo, os grandes edemas da barbela foram mesmo raros. O caso II da fig. I (Est. 78), foi por nós autopsiado. Mostrava sintomas internos graves, mas o aspecto externo do animal era enxuto, sem vestigios de edemas. Acreditamos que os fortes edemas estejam na dependencia de condições climatericas especiais (abundancia de chuvas) que não se verificaram em 1939. Acreditamos entretanto que um edema discreto, subcutaneo, localizado em certas regiões preferenciais, seja muito constante e preceda a lesão necrotica da péle, que aparece na fase seguinte da doença.

As lesões necroticas da péle (esfoliações, rachaduras) desenvolvem-se numa fase tardia, depois da séca dos edemas, ou quando o animal caminha para a convalescença. O couro mostra-se em certas regiões, quebradiço, como casca de arvore sêca. Pódem-se arrancar pedaços do couro necrosado. Tais lesões cutaneas localizam-se de preferencia na barbela, nas axilas e virilhas, nas orelhas e partes posteriores das pernas (fig. J. Est. 78; figs. K e L. Est. 79 e fig. M. Est. 80). Frequentemente, nessa fase, a orelha se mostra dura e coriacea, com descamação intensa. Não raro, depois disso, implantam-se infecções secundarias graves (Est. 80, fig. N) que dão ao animal um aspecto miseravel.

Lesões nos olhos foram constantemente por nós observadas. Lacrimejamento intenso é o sintoma comum. Panoftalmos mais ou menos graves encontramos em quasi todos os animais observados. Em casos mais avançados pódem-se observar hemorragias graves no interior do globo ocular. Uma conjuntivite purulenta, com lacrimejamento intenso, póde ser observada no caso da fig. O. Est. 82.

DADOS COLHIDOS EM AUTOPSIAS

Caso I — Lesão acentuada no olho direito (panoftalmo). Sacrificado. Forte hiperemia com hemorragias localizadas em todos os mesos e no tecido peri-renal. Ausencia de lesões no tubo digestivo. Figado consistente e fortemente amarelado. Vesicula biliar hiperemiada e com pontos hemorragicos. Bile muito pastosa e avermelhada (aspecto de geléa de morango). Urina avermelhada, com albumina, acidos e pigmentos biliares em abundancia. Todos os tecidos, fascias e aponevroses fortemente corados de amarelo. Edema do manubrio do externo, cheio de um liquido fortemente amarelado (côr de canario). O exame microscopico do figado mostrou consideravel acúmulo de gordura com degeneração dos nucleos celulares. O rim apresentou sinais discretos de glomerulo-nefrite.

Caso II — Começo da fase final da doença. Sacrificado. Intensa ictericia. Forte hiperemia e hemorragias das paredes do estomago e intestino (parte alta do intestino delgado). Omaso ressecado e putrefacto. Peritonio pouco atingido pelas hemorragias. Figado um pouco mais consistente que o normal, fortemente impregnado de pigmento amarelo. Enfisêma pulmonar discreto. Pequenos pontos hemorragicos sub-endocardicos e pericardicos. Lesão nos olhos, consistindo em forte hiperemia da esclerótica e panoftalmo. Exame microscopico do figado revelou degeneração gordurosa discreta e sinais de estase biliar, tambem discreta.

*NOTA:* — Autopsias realizadas em anos anteriores pelos Drs. PENHA, V. GRIECO e J. MOREIRA, mostraram, em casos muitos avançados da doença fortes hemorragias no tubo digestivo e peritonio. Muitas vezes, todo o tecido subcutaneo apresentava extensas hemorragias, atingindo os musculos mais superficiais e os ganglios subcutaneos. Casos de tal gravidade não pudemos observar em 1939 (quando chegámos á fazenda os animais tinham sido retirados do pasto novo e estavam provavelmente em caminho de cura). Em compensação tivemos a oportunidade de observar um caso esquemático (Caso II), que indicava como provavel porta de entrada do toxico, o tubo digestivo, porquanto as lesões mais graves verificadas na autopsia, se localizavam no estomago e parte alta do intestino delgado. Esse simples fato sugeriu-nos que se devia tratar realmente de uma planta que, além das suas propriedades fotosensibilizantes, fosse dotada de poder toxico. Veremos adiante que tais suspeitas se confirmaram plenamente.

Caso III — Já francamente na fase final da doença, provavelmente curado. Sacrificado. Lesões graves na péle (fig. M, Est. 80). O exame microscopico de um dos olhos mostrou grandes hemorragias no interior do globo ocular. Ausencia de ictericia, bem como de hemorragias no tubo digestivo e peritonio. Bile ainda um pouco viscosa. Forte hiperemia da vesicula biliar.

Caso IV — Durante a ultima semana permaneceu em decubito lateral, com sintomas gravissimos. Foi sacrificado quando já se apresentava em estado de coma.

Ictericia intensa e fortes hemorragias peritoniais e do tecido perirenal. Hemorragias subcutaneas graves, porém localizadas. Paredes do tubo digestivo intactas. Vesicula biliar fortemente hiperemiada e hemorragica. Bile viscosa e espessa, avermelhada, com o aspecto de geléa de morango. Figado fortemente impregnado de pigmento amarelo-ouro. Edemas subcutaneos localizados no manubrio do esterno, axilas e virilhas. A incisão do edema fazia escorrer um liquido amarelo, côr de canario. Ausencia de lesões da péle.

*Observações*: — Acreditamos que as quatro autopsias realizadas em diferentes estadios da molestia, dão uma idéa da evolução da mesma. O caso I, foi autopsiado certamente na 2.ª fase da doença, quando os sintomas clinicos, ainda presentes, estão associados a lesões da péle já bem acentuadas. O caso II, foi autopsiado num periodo nitidamente de transição da primeira para a segunda fase da molestia: lesões internas graves associadas a um emagrecimento acentuado. O caso III, é um caso de cura, em que os sintomas clinicos e a ictericia haviam completamente desaparecido, ao passo que as lesões necroticas da péle se mostravam muito acentuadas. Finalmente o IV, foi um caso de morte na fase aguda da doença, antes do aparecimento das lesões necroticas da péle. O animal, em estado de coma, apresentava graves hemorragias peritoniais e subcutaneas, bem como edemas subcutaneos localizados.

Os outros casos de que exibimos apenas material fotografico, não foram autopsiados, tendo sido em geral considerados curados; neles, porém, as lesões da péle atingiram uma gravidade excepcional.

## ENSAIOS TOXICOLOGICOS DAS PLANTAS MAIS COMUNS NOS PASTOS AFETADOS PELA DOENÇA

A autopsia do caso II, relatada acima, sugeriu-nos tratar-se de um toxico cuja porta de entrada é o tubo digestivo; portanto, uma herva qualquer, ingerida pelo animal e frequente nos pastos mais atingidos. A idéa de uma planta simplesmente fotosensibilizante foi afastada, não só por aquele fato, como tambem pela alta mortalidade, cerca de 70% de todos os animais que se encontravam no pasto mais atingido. As plantas do tipo do *Hypericum*, que contém apenas um pigmento fluorescente fotosensibilizante, produzem baixa mortalidade: cerca de 3%, de acordo com as experiencias de MARCH & CLAWSON (1928). A existencia provavel de um terrivel toxico tornou relativamente facil a procura da planta responsavel pela doença: o objetivo a atingir passou a ser o encontrar uma planta toxica, ou melhor, um broto de arvore (dadas

as condições em que aparece a doença) que fosse ao mesmo tempo, toxico e capaz de produzir fenomenos de fotosensibilização em bovinos. Colhemos cerca de 30 plantas no pasto de 10 alqueires, onde, em 1939 se desencadeara a doença com grande intensidade. Cada material era triturado e experimentado em cobaias, por via gastrica e sob a forma de extrato aquoso. Habitualmente faziamos um extrato a 40% da planta fresca. Os resultados referidos na Tab. I, mostram que das 20 plantas ensaiadas apenas os materiais 4, 6, 7, 29 e 30 apresentaram algum interesse toxicologico: *Solanum viarum, Sida cordifolia, Holocalyx glaziovii, Asclepias curassavica* e *Mascagnia pubiflora.*

Dessas 5 plantas o *Holocalyx glaziovii* (A l e c r i m) preenchia todas as condições para o aparecimento da doença, ao passo que as quatro outras tinham uma distribuição atipica nos pastos da fazenda. *Solanum viarum, Sida cordifolia* e *Asclepsias curassavica* foram encontradas em grande quantidade em todos os pastos e sobretudo nos mais antigos. São plantas de pequeno porte e o seu aparecimento nenhuma relação mantém com as queimadas e os pastos novos.

Ao contrario o *Holocalyx glaziovii* tem uma distribuição tipica que corresponde exatamente á ocorrencia da doença. E' uma planta de grande porte, muito comum nas florestas da região. Depois das queimadas é encontrada em grande quantidade nas invernadas novas, sob a fórma de tócos que brotam abundantemente depois da primeira chuva do fim de inverno. Em inspeção demorada que fizemos num dos pastos da Fazenda Guanabara, constatamos que os brotos do Alecrim estão sempre muito comidos pelo gado, sendo raro o pé que não se mostra quasi completamente pastado.

De acordo com observações colhidas na fazenda, o Alecrim desaparece completamente depois de 2 a 3 anos de queimadas sucessivas. Procuramos minuciosamente brotos de Alecrim nos pastos mais antigos e não encontramos senão rarissimos pés, aparentemente brotando de raizes mais profundas, poupadas pelo fogo. O numero desses pés é insignificante, em comparação com as abundantes touceiras de Alecrim verdejantes e enormes, das invernadas novas.

Todos esses fatos nos levaram a fixar a atenção nessa planta e prosseguir experiencias em bovinos, procurando realizar envenenamentos agudos e cronicos, o que fizemos, parte na Fazenda Guanabara e parte na Fazenda Mato Dentro de propriedade do Instituto Biologico, em Campinas.

TABELA 1

Ensaios toxicologicos das plantas mais comuns nos pastos da Fazenda Guanabara

| N.º do mat. | N.º da cobaia | Classificação | Quantidade administrada por via gastrica | Observações |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 7206 | *Trema micracanta* *(Ulmacea)* | 40 cc em 20/10 | Sacrif. em 23/10: Ligeira hiperemia gastrica. |
| 1 | 7210 | " " | 40 cc em 20/10<br>20 cc em 21/10<br>30 cc em 21/10 | Sacrif. em 24/10. Nada de anormal. |
| 2 | 7208 | Indeterminada (Est. 75, fig. D) | 60 cc em 20/10<br>30 cc em 21/10<br>30 cc em 23/10 | Sacrificada em 24/10, nada de anormal apresentou. |
| 2 | 7207 | " " | 20 cc em 20/10<br>20 cc em 21/10 | Sacrificada em 23/10, nada de anormal. |
| 3 | 7212 | *Ocotea pulchella* *(Lauracea)* | 25 cc em 20/10<br>25 cc em 21/10 | Sacrificada em 23/10. Ligeira hiperemia gastrica. |
| 3 | 7216 | *Ocotea pulchella* *(Lauracea)* | 20 cc em 21/10<br>20 cc em 23/10 | Sacrificada em 25/10, nada de anormal. |
| 4 | 7245 | *Solanum viarum* *(Solanacea)* | 25 cc às 11,45 de 26/10 | Encontrada morta às 16,40 do mesmo dia. Forte hiperemia gastrica e nos intestinos delgado e grosso. Hemorragias e edemas pulmonares. |
| 4 | 7242 | " " | 20 cc às 12,15 de 26/10 | Encontrada morta às 16,40, mesmo quadro da cobaia 7245. |
| 4 | 7271 | " " | 10 cc em 26/10 | Sacrificada em 28/10. Forte hiperemia gastrica e da parte superior do intestino. |
| 5 | 7232 | *Physalis (Sp)* *(Solanacea)* | 20 cc em 24/10<br>20 cc em 24/10 | Sacrif. em 27/10, nada de anormal. |
| 5 | 7226 | " " | 20 cc em 23/10<br>12 cc em 23/10 | Morreu de acidente na terceira intubação. Estomago e int. normais. |
| 6 | 7219 | *Sida cordifolia* *(Malvacea)* | 20 cc em 23/10 | Morreu de acidente durante a 2.ª intubação. Hiperemia no estomago. |
| 6 | 7115 | " " | 12 cc às 12h de 23/10 | Encontrada morta às 18 h. de 24/10. Edema e hemorragia nos pulmões. Forte hiperemia do estomago. |
| 6 | SN | " " | 10 cc às 12,20 de 23/10 | Encontrada morta em 24/10 às 18 h. Mesmo quadro da cobaia 7115. |
| 6 | 7228 | " " | 20 cc às 15 h. de 24/10 | Encontrada morta às 10 horas de 24/10 mesmo quadro da cobaia 7115. |
| 7 | SN | *Holocalyx glaziovii* (Alecrim) *(Leguminosa Caesalp.)* | 20 cc | Morte em 7 a 10 minutos. Hiperpnéa, convulsões, asfixia. Forte hiperemia gastrica e na parte alta do intestino delgado. |
| 7 | SN | " " " | 10 cc | Morte em 12 minutos. Mesmo quadro da cobaia anterior. |

| N.º do mat. | N.º da cobaia | Classificação | Quantidade administrada por via gastrica | Observações |
|---|---|---|---|---|
| 7 | 7265 | *Holocalyx glaziovii* (Alecrim) *(Leguminosa Caesalp.)* | 5 cc | Sintomas graves. Agonia muito lenta. Morte em 20 minutos. Hiperemia gastrica. |
| 7 | — | — | — | Numerosos ensaios foram realizados com o material 7, que se mostrou sempre muito toxico, quer por via gastrica, peritonial ou subcutanea. A dose letal para uma cobaia de 300 gms., por via gastrica, foi aprox. de 2 gms. de material verde. |
| 8 | 7218 | *Rhynchosia minima (Papilionacea)* | 30 cc em 21/10<br>15 cc em 22/10<br>20 cc em 23/10 | Sacrificada em 24/10. Nada de anormal. |
| 8 | 7213 | *Rhynchosia minima (Papilionacea)* | 20 cc em 21/10 | Sacrificada em 23/10. Ligeira hiperemia do estomago. |
| 9 | 7215 | *Croton urucurana (Euphorbiacea)* | 27 cc em 23/10 | Sacrificada em 23/10. Acentuada hiperemia gastrica. Demais org. normais. |
| 9 | 7227 | " " | 19 cc em 23/10<br>23 cc em 24/10<br>12 cc em 25/10 | Morreu em 26/10. Hiperemia gastrica e intestinal não muito fortes. Enfisêma pulmonar. |
| 9 | 7231 | " " | 10 cc em 24/10 | Não morreu até 28/10. |
| 10 | 7269 | *Chetocalyx brasiliensis. (Leguminosa)* | 17 cc em 26/10 | Não morreu até 4/11. |
| 11 | 7221 | *Myrtacea* (Gen? sp? | 25 cc em 21/10<br>20 cc em 22/10<br>32 cc em 24/10 | Sacrificada em 25/10. Nada de anormal. |
| 11 | 7222 | *Myrtacea* (Gen? sp? | 20 cc em 21/10 | Sacrificada em 23/10. Nada de anormal. |
| 12 | 7203 | *Bauhinia rufa (Legum. ceas.)* | 42 cc em 21/10<br>13 cc em 22/10 | Sacrificada em 24/10. Nada de anormal. |
| 12 | 7214 | " " | 20 cc em 21/10 | Sacrificada em 23/10. Nada de anormal. |
| 13 | 7269 | *Serjania Laruotteana (Sapind.)* | 20 cc em 26/10 | Observada até 2/11, nada de anormal. |
| 13 | 7263 | " " | 15 cc em 26/10 | Sacrificada em 29/10. Nada de anormal. |
| 14 | 7211 | *Copaifera langsdorfii (Legum. caes.)* | 30 cc em 20/10<br>30 cc em 21/10 | Sacrificada em 23/10. Nada de anormal. |
| 14 | 7205 | " " | 40 cc em 20/10 | Sacrific. 22/10. Nada anormal. |
| 15 | 7209 | *Luehea* (Sp?) *(Tiliacea)* | 30 cc em 20/10<br>20 cc em 21/10 | Sacrificada em 23/10. Nada de anormal. |
| 15 | 7220 | " " | 20 cc em 21/10 | Sacrificada em 24/10. Nada de anormal. |
| 16 | SN | *Buttneria ramosissima (Sterculiacea)* | 18 cc em 4/11<br>10 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |

| N.º do mat. | N.º da cobaia | Classificação | Quantidade administrada por via gastrica | Observações |
|---|---|---|---|---|
| 17 | SN | *Rapanea* (sp?) (*Myrsinacea*) | 33 cc em 4/11<br>22 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 18 | 7301 | *Ilex paraguayensis* (*Aquifoliacea*) | 16 cc em 4/11<br>12 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 18 | SN | " " | 23 cc em 4/11<br>12 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 19 | SN | Indeterminada | 49 cc em 4/11<br>17 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 20 | 7311 | *Copaifera langsdorfii* | 17 cc em 4/11<br>12 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 20 | SN | " " | 27 cc em 4/11<br>12 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 21 | SN | *Delbergia* (sp?) (*Papilionacea*) | 20 cc em 6/11<br>20 cc em 4/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 22 | SN | *Sapium* (sp?) (*Euphorbiacea*) | 30 cc em 4/11<br>15 cc em 6/11 | Sacrificada em 7/11. Nada de anormal. |
| 23 | SN | *Tapirira* (sp?) (*Anacardiacea*) | 17 cc em 7/11<br>23 cc em 8/11 | Sacrificada em 9/11. Nada de anormal. |
| 24 | SN | Indeterminada (*Anacardiacea*) | 23 cc em 7/11<br>23 cc em 8/11 | Sacrificada em 9/11. Nada de anormal. |
| 25 | SN | *Lauracea* (Gen? sp?) | 17 cc em 7/11<br>23 cc em 8/11 | Sacrificada em 9/11. Nada de anormal. |
| 26 | SN | *Tibouchina gracilis* (*Melastomacea*) | 19 cc em 7/11<br>17 cc em 8/11 | Sacrificada em 9/11. Nada de anormal. |
| 27 | SN | *Malpighiacea* (Gen? sp?) | 14 cc em 7/11<br>17 cc em 8/11 | Sacrificada em 9/11. Nada de anormal. |
| 28 | SN | *Moquinia polymorpha* (*Composta*) | 22 cc em 7/11<br>17 cc em 8/11 | Sacrificada em 9/11. Nada de anormal. |
| 29 | | *Asclepias curassavica* (*Asclepiadac.*) | — | Muito toxica. Já por nós estudada. |
| 30 | 7481 | *Mascagnia pubiflora* (*Malpighiacea*) | 20 cc às 11,10 | Às 15 horas sintomas gravissimos: tremores, grande excitação, pêlos arrepiados. Às 16 horas morre. Ligeira hiperemia gastrica, forte hiperemia do intestino delgado. Edemas e hemorragias pulmonares. |
| 30 | 7480 | " " | 14 cc às 11 h. | Às 16,30 foi encontrada muito mal, com tremores generalizados. Extremidades frias. Às 17 horas estava morta. Mesmo quadro da cobaia anterior. |
| 30 | 7482 | " " | 10 cc às 11 h. | Às 16,30 foi encontrada morta. Ausencia de hiperemia gastrica. Forte hiperemia do intestino delgado. |

NOTA: A classificação das plantas cujos nomes figuram no quadro acima foi feita gentilmente pelos Drs. F. C. Hoehne e J. F. Toledo do Departamento de Botanica do Estado.

PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS DO "ALECRIM"
(*Holocalyx glaziovii* TAUB.)

Na Est. 81 pódem-se ver detalhes da planta *Holocalyx glaziovii*, da familia das leguminosas (*Caesalpinoidea*). Pódem-se ver alguns frutos, cujo detalhe é dado no canto da figura (Est. 81, *b*). Os foliolos têm nervuras paralelas.

Os animais que recebem por via gastrica ou subcutaneamente, doses mortais do extrato aquoso do Alecrim, morrem rapidamente com a sintomatologia do envenenamento pelo acido cianidrico. O extrato aquoso tem o cheiro caracteristico de amendoas amargas e desprende acido cianidrico pelo aquecimento em tubo de ensaio, o que póde ser evidenciado pelo test descrito por HENRICI: um retangulo de papel embebido em sol. a 0,5% de acido picrico em 0, 5% de carbonato de sodio, e colocado na abertura de um tubo de ensaio é aí fixado por uma rolha que feche hermeticamente o tubo. Colocado o extrato de Alecrim no tubo e aquecido em banho-maria, ao fim de 15 minutos o papel adquire coloração nitidamente avermelhada *(pink)*. A coloração se acentúa ao fim de algumas horas.

Realizámos experiencias em gatos, sob anestesía, para verificar os efeitos de um extrato aquoso de Alecrim, injetado em doses fracionadas, no peritonio. A fig. 1 representa um traçado da pressão arterial e da respiração de um gato de 3,5 kilos de peso. Póde-se ver que depois de uma primeira injeção (seta 1) a respiração se mostra fortemente acelerada durante alguns minutos, enquanto a pressão cáe de 110,5 mm Hg a 90 mm Hg. Pouco antes da 2.ª injeção a bradipnéa era já muito nitida, acentuando-se notavelmente á segunda injeção (seta 2). Póde-se ver que a bradipnéa forte, seguida de parada da respiração, precedeu nitidamente a quéda mortal da pressão arterial. As propriedades do extrato correspondem assim ao que classicamente se sabe a respeito do envenenamento agudo pelo acido cianidrico.

EXPERIENCIAS EM BOVINOS

A tabela 2 mostra experiencias em 9 bovinos, realizadas com extrato aquoso da planta. A nossa preocupação foi realizar sobretudo experiencias de envenenamento cronico pelo Alecrim. Realmente, na Fazenda Guanabara, a doença se apresenta com um carater cronico, sendo rarissimos os casos de morte súbita. Mas mesmo em tais casos de morte súbita a autopsia revela sintomas do envenenamento cronico que

precedeu a ingestão da dose mortal de Alecrim. Ordinariamente os animais apresentam forte ictericia, extensas hemorragias subcutaneas e peritoneais, bile espessa e degeneração gordurosa do figado, mais ou menos acentuada. No caso do bovino n.º 5, que recebeu durante 15 dias, diariamente, determinadas doses de Alecrim, ao fim de 20 dias de experiencia, apareceu um quadro morbido quasi identico ao da

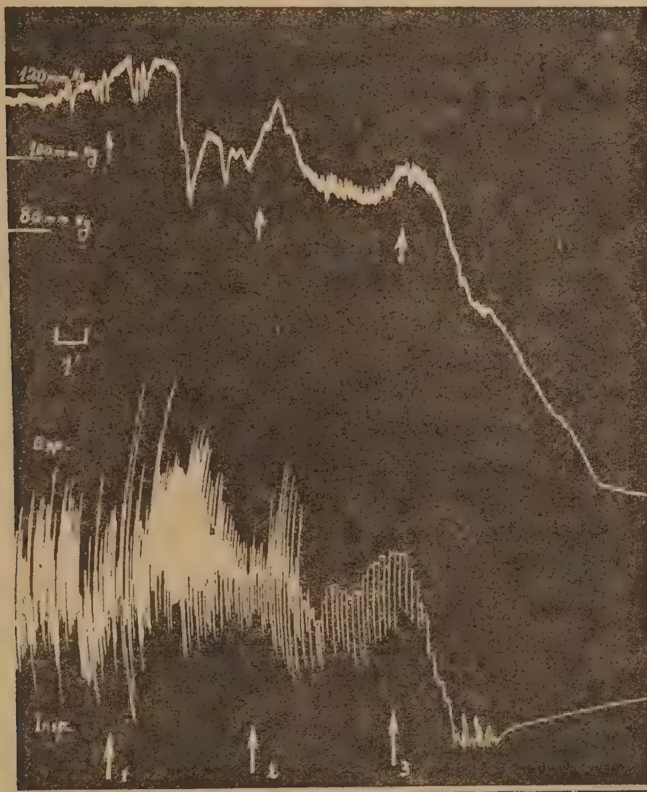


Fig. 1 — Ensaio farmacológico realizado em gato. Nas sêtas, três injeções intraperitoneais de um extrato aquoso concentrado de *"Holocalyx glaziovii"*.

doença no campo. Durante a ultima semana o animal permaneceu em estado de coma, com a respiração dificil, estertorosa. Durante essa ultima semana a péle se mostrou extraordinariamente dura em quasi toda a região do dorso, nas ancas e ainda na barbela. Tres dias antes de morrer, apresentou extensas rachaduras do couro, adquirindo este ultimo o aspecto de casca de arvore sêca (Est. 82, fig. P; Est. 83 e

Est. 84). A autopsia mostrou formidavel ictericia, fortissimas hemorragias subcutaneas, na barbela, no dorso, nas virilhas e axilas. Hemorragias menos intensas nas pernas e quasi ausentes na parte inferior do abdomen. Bile espessa, avermelhada com o aspecto e consistencia de geléa de morango. O exame microscopico do figado revelou degeneração gordurosa acentuadissima e acúmulo de pigmentos biliares.

Esse caso mostrou claramente que em condições mediocres de clima e de iluminação (a maioria dos dias foram sombrios ou chuvosos) é possivel reproduzir a doença em quasi todos os seus detalhes, pela ingestão de pequenas doses diarias de "Alecrim".

O bezerro n.º 6 morreu, podiamos dizer, acidentalmente, pela ingestão de uma dose de Alecrim. Não observamos portanto, nesse caso, a agonia lenta que precedeu a morte do bovino n.º 5. A autopsia mostrou extensas e graves hemorragias subcutaneas, com localização preferencial na barbela, axilas e virilhas, de ambos os lados (Est. 85). Os ganglios superficiais, bem como os musculos do dorso, apresentavam graves hemorragias antigas e recentes. Este caso, em que só uma prova de Hay, feita uma semana antes, deu um resultado fracamente positivo, e em que uma prova de Van den Bergh, feita pouco antes da morte, se mostrou negativa, é um documento indiscutivel de que o desencadeamento dos sintomas graves, de fotosensibilização, como fortes hemorragias subcutaneas, precede a ictericia. A autopsia não revelou nenhuma impregnação dos tecidos pelos pigmentos biliares. A ictericia forte que foi observada na autopsia do caso n.º 5 e que é observado como regra nos animais da fazenda Guanabara, é indiscutivelmente uma manifestação tardia da doença, provavelmente consequencia das fortes hemorragias que parecem ser um sintoma muito tipico da primeira fase do envenenamento cronico pelo Alecrim. A superprodução de pigmentos biliares que sucede á hemolise que acompanha o fenomeno hemorragico, poderia talvez explicar aquela ictericia.

Sintomas oculares são, como vimos anteriormente, muito frequentes nos casos observados na fazenda Guanabara Nas nossas experiencias apareceu com grande intensidade uma forte lesão ocular, lacrimejamento intenso, forte hiperemia da esclerotica e panoftalmo, no caso do bezerro n.º 2 (Est. 86, fig. S). Atribuimos o fato de só nesse animal a lesão se apresentar com tal gravidade, á intensidade do fator externo (luz solar) na fazenda Guanabara, onde esta experiencia foi realizada. Em Campinas, na fazenda Mato Dentro, ape-

nas em 2 ou 3 casos se apresentou um lacrimejamento intenso (muito acentuado no bezerro n.º 4 e fortissimo algumas horas antes da morte do bezerro n.º 7), mas nunca observamos panoftalmo, como se apresentou de maneira nitida na experiencia da fazenda Guanabara. A fotofobia é sinal constante e muito tipico, que aparece imediatamente depois de cada administração de Alecrim (Est. 86, fig. T e Est. 87). O animal aperta fortemente as palpebras, num movimento ativo e demorado. Nos casos mais graves, permanecia de 20 a 40 minutos com os olhos cerrados, depois de cada administração de Alecrim.

Na experiencia com o bezerro n.º 2, pudémos verificar de maneira nitida alterações do rítmo respiratorio, indiscutivelmente associadas á exposição do animal á luz solar. Pela manhã á sombra, e á tarde, depois do pôr do sol, a respiração era sempre normal, cerca de 20 por minuto. Trazido para o sol, já ao fim de 20 minutos, a aceleração da respiração era visivel, atingindo ao fim de poucas horas 60 a 80 por minuto. Durante o dia, 2 horas, o animal apresentava-se ofegante (*panting*) com a respiração rapida e ruidosa, muitas vezes atingindo 160 e 170 por minuto. Observações analogas foram feitas com o animal n.º 4, na fazenda Mato Dentro. No dia 15/12, quando foi observado demoradamente em sol aberto, apresentou intenso lacrimejamento e fotofobia forte. A respiração, que pela manhã era de 18 a 20 por minuto, ás 11 horas era de 60, e ás 13 horas de 130, por minuto. Ás 13 horas o animal se mostrava ofegante, de cabeça baixa, arquejando (*panting*). Na experiencia com o animal n.º 6, em que foram tomadas diariamente a temperatura e o numero de respirações, póde-se observar uma elevação da temperatura a 40º no dia 13/1, ao passo que a temperatura habitual, antes da experiencia, esteve compreendida entre 37º,8 e 38º,7 (mesmo em dias de sol aberto). No dia 17/1, o rítmo respiratorio atingiu 84 por minuto, que foi o maximo observado em toda a experiencia.

*

* *

Por essa rezenha rapida dos acontecimentos mais importantes ocorridos durante as numerosas experiencias que estão sumariadas na Tab. 2, póde-se ver que os sintomas se apresentam na seguinte ordem de acordo com a frequencia: 1.º) Lacrimejamento intenso e fotofobia. 2.º) Polipnéa grave (*panting*). 3.º) Hemorragias subcutaneas mais ou menos extensas ou graves localizadas em pontos preferenciais. 4.º) Le-

sões ligeiras da péle, como descamação, quédas de pêlo, etc. localizadas igualmente em certos pontos preferenciais. 5.º) Extensas lesões da péle, como rachaduras e necrose do couro. Antigas hemorragias no tecido subcutaneo. 6.º) Ictericia, com espessamento da bile e degeneração gordurosa do figado. Hemorragias no peritoneo e pericardio.

Os sintomas dispostos nessa ordem dão uma idéa do desenvolvimento da doença reproduzida experimentalmente pela ingestão cronica do Alecrim. Sintomas ligeiros, como lacrimejamento intenso, fotofobia e polipnéa acentuada, pódem aparecer já nos primeiros dias de administração da planta. Feita a autopsia de alguns casos em que a morte ocorreu em pouco mais de uma semana de experiencia (exp. n.º 2 e exp. n.º 4), não havia nem ictericia nem ainda hemorragias no tecido subcutaneo, mas apenas pequenos pontos hemorragicos no dorso. O desenvolvimento de fortes lesões hemorragicas no tecido subcutaneo parece coincidir com o aparecimento de lesões iniciais na péle, como ligeira descamação e quédas de pêlo, localizadas. A ictericia, o espessamento da bile e as extensas rachaduras do couro, parecem caracteristicas da ultima fase da doença. Ao lado de hemorragias muito antigas, subcutaneas, pódem ser vistas extensas hemorragias no peritonio e pericardio.

Finalmente a experiencia n.º 9 foi realizada com o objetivo de esclarecer exatamente a parte dos sintomas que correspondem ao envenenamento pelo Alecrim, isto é, á toxidez primaria da planta, e a parte que corresponde ao efeito da luz do sól. O resultado inesperado dessa experiencia mostra que t o d o s os sintomas observados por nós nas experiencias de envenenamento cronico com a planta, devem ser atribuidos a uma combinação do efeito da planta com a luz do sól. Efetivamente o bovino da experiencia n.º 9, mantido em quarto sombrio durante 31 dias, recebendo diariamente dóses pelo menos tão fortes como as que receberam os bovinos expostos á luz, ao fim daquele praso mostrava excelente aspecto, apenas ligeiramente emagrecido, com a sua resistencia á planta ainda normal. Sacrificado no 31.º dia de experiencia, apresentou um aspecto absolutamente normal, na autopsia. O tecido subcutaneo normal e sem nenhum sinal da menor hemorragia. Ora, os animais alimentados ao sól, já ao fim de 8 ou 10 dias mostravam diminuida a sua resistencia á planta, e ao fim de 12 a 15 dias tinham um aspecto miseravel e morriam invariavelmente entre o 15.º e o 23.º dia, com sintomas gravissimos.

A conclusão que se poderia tirar dessa serie de experiencias é que o Alecrim, dado em pequenas doses, é extremamente perigoso quando a sua ação é combinada com a exposição á luz do sól. Todos os sintomas que aparecem na Fazenda Guanabara, sobretudo as extensas hemorragias subcutaneas e peritoniais, devem ser atribuidas á ação combinada do Alecrim com o forte sól de Noroeste. Aliás a simples localização preferencial das hemorragias no tecido subcutaneo e nas regiões da barbela, axilas e virilhas, ás vezes com exclusão de hemorragias no peritonio e tubo digestivo, sugeriam claramente que o agente determinante delas é externo, porquanto o toxico teria oportunidade de agir mais intensamente no abdomen, onde a sua concentração é maxima depois de cada administração.

Acreditamos que a localização das hemorragias no tubo digestivo, como foi por nós observado na autopsia do caso II da Fazenda Guanabara, póde ser explicada, não por uma ação diréta do acido cianidrico da planta, mas por uma diminuição de resistencia dos vasos e tecidos nos pontos que foram atingidos por aquele veneno, o que permitiria que o toxico, predominantemente hemorragico, fabricado sob a ação da luz solar, fosse exercer mais intensamente a sua ação naqueles pontos de menor resistencia.

A experiencia n.º 8, de administração cronica de cianeto de potassio, 3 vezes ao dia, em doses subletais, mostraram ao fim de 27 dias extensas hemorragias subcutaneas (Est. 89), lembrando as do caso da experiencia n.º 6, embora mais fracas.

TABELA 2

Experiencias de envenenamento agudo e cronico de bovinos com o Alecrim.

Bezerro 1. Aproximadamente 150 quilos. 6/11/39. Recebeu por via gastrica uma quantidade de extrato aquoso da planta, correspondente a 1.200 gms. Depois de 3 minutos de terminada a administração, o animal cambaleou e caíu. Polipnéa e forte agitação. Movimentos espasmodicos das patas. Sinais evidentes de asfixia. Respiração profunda. Agonia lenta. 13 a 14 minutos depois do começo da experiencia, estava morto. A autopsia mostrou estáse no figado e enfisêma pulmonar discreto. Demais orgãos normais.

Bezerro 2. Aprox. 180 quilos. Côr preta. Começo da experienciа: 6/11/39. Fazenda Guanabara.

| | | |
|---|---|---|
| 6/11/39 | 400 gms (em 2 vezes) | |
| 7/11/39 | 1.000 gms (em 3 vezes) | Fastio e sintomas ligeiros no momento da administração. |
| 8/11/39 | 1.600 gms (em 3 vezes) | Sintomas graves depois de cada administração. Recuperação rapida. |
| 9/11/39 | às 9,30 recebeu 450 gms.<br>às 12 h. " 600 gms.<br>às 17 h. " 300 gms. | Ás 2 horas desse dia foi notada uma lesão muito nitida nos olhos: nuvem branca com lacrimejamento abundante. |

| | | |
|---|---|---|
| 10/11/39 | 1.800 gms (em 3 vezes) | Durante toda a manhã mostrou sintomas de fotofobia acentuada, com blefaroespasmo, sobretudo no olho direito. |
| 11/11/39 | 1.800 gms (em 3 vezes) | Pela manhã o bezerro foi encontrado à sombra. Foi retirado e trazido para o sól. Sól forte, sem uma nuvem. A lesão nos olhos, às 13 h. estava muito agravada. Lacrimejando abundante. Panoftalmo com uma pequena escára no centro. O animal dava mostra de grande irritação, sobretudo quando o olho era aberto e deixado algum tempo ao sól. Forte blefaroespasmo. Diarréa. |
| 12/11/39 | 1.300 gms (em 3 vezes) | Às 13,30 mostrava forte polipnéa (cerca de 70 respirações por minuto). Respiração ofegante, ruidosa *(panting)*. A lesão no olho direito muito agravada. O olho esquerdo mostra forte hiperemia da esclerótica e já uma nuvem branca sob a cornea. Às 16 h. forte polipnéa (170 por minutos). Às 18 horas o sól tinha desaparecido. O animal estava de pé, calmo, sem dispnéa (20 respirações por minuto). |
| 13/11/40 | 700 gms (em 1 vez) Às 15 horas recebeu uma dose muito forte da planta e morreu em poucos minutos. | Pela manhã o animal estava na sombra e apresentava respiração normal. Trazido para o sól, começou a dispnéa, que se agravou progressivamente (60 respirações por minuto). Às 11,30 mostrava-se ofegante (120 respirações por minuto). Às 14 horas dispnéa gravissima (170 por minuto). |

Autopsia: Aponevroses ligeiramente coradas de amarelo (muito leve). Ausencia de acidos e pigmentos biliares na urina. Pequeno acúmulo de tecido infiltrado de amarelo na anca direita. Vesicula biliar hiperemiada, com a bile ligeiramente viscosa, apresentando entretanto o seu aspecto verde habitual. Ausencia de hemorragias no tubo digestivo e mesos. Pequenas hemorragias puntiformes no tecido subcutaneo do dorso. Exame microscopico mostrou figado normal e apenas alguns sinais de glomerulite no rim. Demais órgãos normais.

Novilha 3. Aprox. 180 quilos. De 6-12-39 a 9-12-39 recebeu diariamente 60 gms. de Alecrim na Fazenda Mato Dentro. Não apresenta sintoma digno de nota. Às 12,30 de 9/12 foi encontrada morta (morte acidental). Autopsia mostrou apenas forte hiperemia da vesicula biliar.

Bezerro 4. Aproxim. 130 quilos. Começo da experiencia 9/12/39 (Fazenda Mato Dentro).

| | | |
|---|---|---|
| 9/12/39 | 1.400 gms (em 3 vezes) | |
| 10/12/39 | 1.400 gms (em 2 vezes) | Sintomas graves a cada administração. Dia encoberto e chuvoso. |
| 11/12/39 | 1.000 gms (em 2 vezes) | Idem, Idem. Dia encoberto. |

| | | |
|---|---|---|
| 12/12/39 | 1.800 gms (em 3 vezes) | O animal se mostra cada vez mais abatido. A cada administração da planta os sintomas são mais acentuados. O animal se mostra agitado e depois de alguns minutos da administração, cáe e permanece prostrado durante 20 minutos a 1/2 hora. Tempo encoberto e chuvoso. |
| 13/12/39 | 1.800 gms (em 3 vezes) | |
| 14/12/39 | 1.800 gms (em 3 vezes) | |
| 15/12/39 | 1.200 gms (em 2 vezes) | Sol aberto, forte. Pela manhã respiração normal (18 a 20 por minuto) Às 11 horas polipnéa (60 por minuto), antes da primeira administração do Alecrim. Lacrimejamento intenso. Conjuntiva amarelada (?). Às 13 horas forte polipnéa (130 por minuto). Fotofobia intensa. Às 14 horas respiração acelerada e ruidosa *(panting)*. |
| 17/12/39 | 1.200 gms (em 2 vezes) | Todos os sintomas de fotosensibilização muito agravados. Polipnéa forte. Depois da administração de 600 gms. da planta, às 15 horas, morreu em poucos minutos. |

Autopsia: A segunda dose administrada em 17/12 (600 gms.) foi uma dose que o animal sempre suportara. Devemos admitir que naquele dia a sua resistencia estava de tal maneira reduzida que a mesma dose habitual produziu a morte em poucos minutos. A autopsia mostrou apenas uma forte hiperemia da vesicula, mais intensa em torno do pediculo. Bile nitidamente viscosa e avermelhada. Ausencia de hemorragias no estomago e intestinos e peritonio. Exame microscopico do figado: normal.

N o v i l h a 5: Peso aproximado 190 quilos. Começo da experiencia 6/12/39 (Fazenda Mato Dentro).

| | | |
|---|---|---|
| 6/12/30 | 400 gms (em 1 vez) | Depois da administração esteve deitada 10 minutos. |
| 7/12/39 | 400 gms (em 1 vez) | Depois de cada administração da planta apresenta tremores musculares. Algumas vezes permanecia deitada 15 a 20 minutos. No dia 9/12 apresentou primeiros sinais de fotofobia. |
| 8/12/39 | 400 gms (em 1 vez) | |
| 9/12/39 | 1.200 gms (em 2 vezes) | |
| 10/12/39 | 800 gms (em 2 vezes) | |
| 11/12/39 | 800 gms (em 2 vezes) | Os efeitos produzidos pelą administração da planta tornam-se cada vez mais acentuados. O animal permanece deitado uma ou duas horas, sonolento, com a respiração dificil. Os sintomas aparentes de fotosensibilização não são muito acentuados: ligeiro lacrimejamento e dispnéa não muito forte. Tempo encoberto e chuvoso até 15/12. |
| 12/12/39 | 1.800 gms (em 3 vezes) | |
| 14/12/39 | 1.800 gms (em 3 vezes) | |
| 15/12/39 | 1.200 gms (em 2 vezes) | |
| 16/12/39 | 1.200 gms (em 2 vezes) | Depois de cada administração o animal apresenta sintomas gravissimos. Permanece deitado cerca de 2 horas. Apresenta sinais mais nitidos de fotosensibilização: lacrimejando e fotofobia. Dia claro, sól forte. |

| | | |
|---|---|---|
| 17/12/39 | 1.200 gms (em 2 vezes) | Depois da 2.ª dose de 600 gms, dada às 15 horas, o animal caíu aparentemente em estado de coma e assim passou o resto do dia e os dias subsequentes. Às 14 horas começou uma chuva que se prolongou por toda a semana. |

Observações: Foram suspensas as administrações da planta no dia 17/12/39. O animal permaneceu toda a semana seguinte aparentemente em estado de coma, tendo sido removido para um lugar sombrio e protegido. Na 4.ª feira, 20/12 o couro se apresentou, à palpação, extremamente duro, necrosado (?) em toda a região lateral do abdomen e no dorso. A temperatura oscilou entre 39,9.° e 38,3.°, descendo finalmente a 37,5.° no dia 22/12. No dia 23/12 apresentou lesões cutaneas muito nitidas: rachaduras da pele em toda a região mais exposta, tronco, axilas e barbela (fig. P e Ests. 83 e 84). O animal morreu no dia 24/12/39 às 14 horas. A autopsia realizada no dia 25/12 mostrou forte impregnação dos tecidos por pigmentos biliares. Tecido subcutaneo, bem como fascias e aponevroses, fortemente corados de amarelo. Destacadas as crostas da péle, mostravam a face interna fortemente amarelada. Hemorragias em todo o peritonio e pericardio. Pulmão com enfisêma, edema e hemorragias. Figado intensamente corado de amarelo-ouro. Vesicula biliar fortemente hiperemiada, contendo uma bile espessa, semisolida, avermelhada (como gelea de morango). Rim amarelado e fortemente hiperemiado. Extensas e antigas hemorragias em todo o tecido subcutaneo, mais intensas entretanto na barbela, partes lateral e dorsal do tronco. O exame microscopico do figado mostrou um grande acumulo de gordura, com sinais evidentes de degeneração celular.

Garrote 6. Aproximadamente 230 quilos. Começo da experiencia em 21/12/39 (Fazenda Mato Dentro).

| | | |
|---|---|---|
| 21/12/39 até 26/12/39 | | Observado antes da administração do Alecrim. Maximo de temperatura ao sól, 38,7.°; maximo de respiração ao sól, 22 respirações por minuto. |
| 26/12/39<br>27/12/39<br>28/12/39 | 600 gms (em 1 vez)<br>1.200 gms (em 2 vezes)<br>1.800 gms (em 3 vezes) | Sintomas ligeiros depois de cada administração. Maximo de temperatura ao sól 39,3.°. Maximo de respirações ao sól 35 por minuto. Nenhum sinal nitido de fotosensibilização. |
| 29/12/39 | 2.250 gms (em 3 vezes) | Forte hiperemia no olho esquerdo. Fotofobia. Temperatura maxima 39,6.°. Respiração maxima 39 por minuto. |
| 30/12/39 | 2.300 gms (em 3 vezes) | Temp. max. 39.° Resp. maxm. 40 p.m. |
| 31/12/39<br>1/1/40<br>2/1/40<br>3/1/40 | 1.600 gms (em 2 vezes)<br>1.200 gms (em 2 vezes)<br>1.600 gms (em 2 vezes)<br>2.000 gms (em 3 vezes) | Acentuou-se notavelmente a hiperemia no olho esquerdo. No dia 2/1 observado demoradamente: intenso lacrimejamento no olho esquerdo; fotofobia acentuada. Temperatura max. 39,2.°. Resp. max. 48 por minuto. No dia 3, catarro amarelo no nariz. Prova de Hay negativa na urina. |

| | | |
|---|---|---|
| 4/1/40 | 2.100 gms (em 3 vezes) | Sintomas cada vez mais graves em seguida a cada administração. Permanece muito tempo deitado. Fotofobia. Temperatura maxima 39,1.º. Respiração maxima 30 por min. |
| 5/1/40 | 2.150 (em 3 vezes) | |
| 6/1/40 | 1.500 gms (em 2 vezes) | |
| 7/1/40 | 750 gms (em 1 vez) | |
| 8/1/40 | 2.250 gms (em 3 vezes) | A péle se mostra mais consistente na região do dorso. Tempo nublado. |
| 9/1/40 | 2.100 gms (em 3 vezes) | |
| 10/1/40 | 2.250 gms (em 3 vezes) | Sintomas muito graves, depois de cada administração. Temp. max. 39.º. Resp. max. 20 por minuto. Dia 10/1: prova de Hay fracamente positiva. |
| 12/1/40 | 2.250 gms (em 3 vezes) | Permanece muito tempo deitada depois de cada administração. Temp. max. 39,5.º. Resp. max. 70 por min. Fotofobia intensa. Barbela engrossada. Acentuou-se o espessamento da pele no dorso. |
| 13/1/40 | 1.500 gms (em 3 vezes) | Fotofobia intensa. Temp. max. 40.º. Resp. max. 62 p. m. Prova de Hay positiva na urina. Nitida descamação da pele na papada. |
| 14/1/40 | 750 gms (em 1 vez) | O animal apresenta aspecto miseravel. Emagrecimento muito forte. Acentúa-se a descamação da papada. Nas axilas e virilhas nitida descamação. A resistencia do animal à dose habitual da planta se mostra diminuida. Reação de Van den Bergh direta e indireta no sôro sanguineo, negativa. |
| 15/1/40 | 1.500 gms (em 2 vezes) | |
| 16/1/40 | 2.250 gms (em 3 vezes) | Temp. max. 39,8.º. Resp. max. 72 por minuto. Fotofobia muito acentuada. |
| 17/1/40 | 2.300 em (3 vezes) | Notam-se quedas de pêlo na papada, axilas e virilhas. Edema discreto da papada. Temp. max. 39,5.º. Resp. max. 84. |
| 18/1/40 | 2.300 gms (em 3 vezes) | Descamação nitida, embora discreta, nas regiões laterais do abdomen. Pele fortemente endurecida e aderente no dorso. Temp. max. 39,3.º. Resp. max. 36 p. m. Morreu durante a noite. |

Autopsia: Realizada às 14 horas de 19/1/40. O que dominou o quadro da autopsia foram as intensas hemorragias subcutaneas, nos musculos superficiais do dorso e nos ganglios, tambem superficiais. Hemorragias intensas acompanhadas de edemas, localizadas sobretudo na papada, nas axilas e virilhas (de ambos os lados), em quasi toda a região do dorso, sobretudo nas ancas, onde a péle se mostrava aderente. Sinais de hemorragias antigas, correspondendo em certos lugares à descamação externa da péle. Ausencia de ictericia. Bile fluida e amarela. Vesicula distendida mas sem hiperemia. Ausencia de hemorragias nos órgãos abdominais. Edema forte da laringe e glóte (?). Degeneração do miocardio, nos musculos papilares.

Bezerro 7. Aproximadamente 130 quilos. Fazenda Mato Dentro. Côr cinzenta amarelada. Desde o dia 6/12/39 foi alimentado à vontade, com uma ração de capim ao qual era adicionado 1/3 de Alecrim cortado em pequenos fragmentos. O animal comia tranquilamente a mistura (cerca de 1 quilo de Alecrim e 2 quilos de capim por dia). Durante os 36 dias que precederam a morte o tempo esteve chuvoso e os dias de sól foram raros (cerca de 6 ou 7). Durante os 10 dias anteriores ao desencadeamento dos sintomas choveu continuamente e o animal nada apresentou de anormal. No dia 12/1/40 abriu um sól forte. Pela manhã o animal mostrava-se com o aspecto habitual. Respiração e temperatura normais. Às 12 horas começou a apresentar sintomas graves de fotosensibilização: grande agitação, lacrimejamento intenso e blefaroespasmo. A temperatura subiu rapidamente a 40.° e a respiração a 48 p. m. O animal passou o resto do dia em estado de profunda adinamia, deitando-se frequentemente. Na manhã seguinte, os mesmos sintomas se mostraram muito acentuados: intenso lacrimejamento e fotofobia forte. Temp. maxima 39,5.°. Resp. max. 120 por minuto. Encontrado morto ao meio dia de 14/1/40. A autopsia nada revelou de importante, exceto edema e enfisêma pulmonar com certas zonas de hepatização.

Observação: Se não fossem os sintomas pronunciados de fotosensibilização que precederam a morte, bem como as condições climatericas que sugerem fortemente a ocorrencia de um "golpe de sól", poderiamos admitir a intercurrencia, nesse caso, de uma pneumonia fulminante. O caso é entretanto apresentado aqui com esta ultima ressalva, exigindo verificações futuras.

Garrote 8. Aproximadamente 230 quilos. De 17-1 até 8-2-40 foram administradas doses toxicas de cianeto de potassio, 3 vezes ao dia. Durante todo o tempo da experiencia foram observados alguns dos sintomas tipicos da administração do extrato de Alecrim: depois de cada administração o animal cambaleava, apresentava tremores musculares e muitas vezes caía, para se levantar 10 a 15 minutos depois. Dessa maneira tinhamos alguns sinais indicativos de que a dose de cianeto administrada por vez (1,4 gm) correspondia aproximadamente à quantidade habitual de extrato administrado aos outros animais em condições semelhantes. Uma enorme diminuição de resistencia que se traduziu por consideravel agravamento dos sintomas depois de cada administração, foi observada a partir do 12.° dia. Os sinais aparentes de fotosensibilização foram escassos durante a experiencia: elevação de temperatura, que atingiu um maximo de 39,8.° em 29/1/40 e uma aceleração do ritmo respiratorio, que atingiu 40 respirações por minuto, no dia 24/1/40, e finalmente fotofobia nitida depois de cada administração do cianeto. Particularmente a elevação de temperatura tem uma significação especial, porquanto o envenenamento pelo acido cianidrico é ordinariamente acompanhado de forte abaixamento de temperatura. A prova de Hay na urina, bem como a reação de Van den Bergh no sôro sanguineo, foram sempre negativas.

No dia 8/2/40, depois da 3.ª administração de cianeto de potassio (1,4 gm), o animal caíu prostrado em coma e morreu em 15 minutos. A autopsia mostrou extensas hemorragias subcutaneas com localização preferencial na papada, axilas, virilhas e parte superior do tronco. Os ganglios super-

ficiais se mostravam fortemente hemorragicos; foram verificadas hemorragias nos musculos superficiais. Pulmão com edemas e enfisêma discretos.

Observação: O aspecto das hemorragias subcutaneas, embora muito menos intensas, lembrava, pela localização, as hemorragias do animal 7, que recebeu o Alecrim.

Garrote 9. Aproximadamente 240 quilos. Fazenda Mato Dentro. Experiencia realizada em quarto sombrio, quasi completamente escuro. Durante 31 dias forçamos a dose de Alecrim de maneira a ultrapassar de muito o maximo administrado aos outros animais. Durante cada administração o animal mostrou, desde o inicio, apenas sintomas leves. Forçamos a dose até 1 quilo da planta por vez, sem que o animal mostrasse qualquer agravamento dos sintomas. A temperatura e o numero de respirações mantiveram-se proximo do normal durante todo o tempo da experiencia. Durante os 31 dias de experiencia o animal recebeu ao todo cerca de 55 quilos da planta sob a forma de extrato aquoso. No dia 20/2/40 foi sacrificado às 15 horas.

Autopsia: Nada revelou de anormal. Tecido subcutaneo normal. Orgãos normais.

Observações: Se compararmos esse caso com o de outros animais que receberam extratos de Alecrim e foram mantidos ao sól, a diferença de tempo e de quantidade da planta administrada é de tal ordem que nos leva a admitir como demonstrada a ação coadjuvante indispensavel do sól, na produção dos sintomas cronicos da doença que estudamos. O Alecrim dado em pequenas doses diarias, em lugar sombrio, é muito bem suportado pelo animal durante um tempo muito longo, ao passo que se a sua ação é combinada com a exposição do animal à luz do sól, ao fim de 12 a 15 dias o animal começa a apresentar sintomas alarmantes e ao fim de 15 a 23 dias a morte ocorre, precedida ou não de um coma prolongado.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os sintomas externos da doença, que designamos como "Peste das queimadas", dada a relação existente entre ela e as extensas queimadas de florestas virgens em certas regiões do Estado de São Paulo, sugeriu-nos fortemente a participação, na sua etiologia, de um fator externo: a luz solar, muito intensa nas zonas em que foi assinalada.

A semelhança de certos dos sintomas externos, como edemas e rachaduras da péle, com os de outras doenças já descritas em carneiros na Africa do Sul, Italia e Estados Unidos, e ainda o fato de que animais brancos são mais atacados que os pigmentados, e de que nos animais não totalmente pigmentados, as lesões se localizam nas regiões mais claras da péle, reforçaram consideravelmente aquela suposição.

Havia de inicio uma dificuldade na comparação dos sintomas aqui observados, com os de outras doenças verificadas em outros países. Não pudemos obter, na literatura, nenhuma descrição de sintomas graves de fotosensibilização em bovinos. Todos os casos de fotosensibili-

zação bem estudados, com graves lesões na péle e de importancia economica apreciavel, ocorrem em carneiros (hipericismo, tribulose ovina). Uma mortalidade extensa e de consideravel importancia economica como a verificada na Fazenda Guanabara, em bovinos, parece ser a primeira descrita na literatura mundial. Isso nos levou a abandonar a comparação dos sintomas com os de doenças de fotosensibilização em carneiros e procurar observa-los e descreve-los como se apresentam nos bovinos. Particularmente a existencia de um revestimento de lã, nos carneiros, determina uma distribuição tipica das necroses e escaras da péle, que certamente não se pode repetir no boi, desprovido daquela proteção. Esse fato estabelece uma diferença na localização das lesões, que no carneiro se apresentam de preferencia na cabeça, orelhas e face posterior das pernas, ao passo que no boi a barbela, as axilas e virilhas, as partes laterais do tronco são localizações preferenciais das necroses cutaneas.

As experiencias realizadas em Campinas, na Fazenda Mato Dentro, explicam o elevado indice de mortalidade observado na Fazenda Guanabara. Em 100% dos bois que receberam cronicamente extratos de "Alecrim", sintomas graves de fotosensibilização e forte diminuição de resistencia puderam ser observados. Isso distingue nitidamente os efeitos produzidos pelo *Holocalyx*, dos produzidos por outras plantas que, sem ser toxicas, contém um pigmento fotosensibilizante *(Hipericum, Polygonum fogopyrum)*. E' sabido que o indice de mortalidade de animais alimentados com tais plantas não é superior a 2 ou 3% (MARSH & CLAWSON). A possibilidade de uma reprodução de sintomas da doença em todos os casos experimentados, distingue tambem os efeitos do *Holocalyx* dos produzidos pelo *Tribulus terrestris*. Desde 1918 numerosos pesquisadores, na Africa do Sul (THEILER, QUIN, RIMINGTON, etc.), procuram reproduzir com regularidade o Geeldikkop (tribulose ovina) pela administração intensiva de *Tribulus terrestris* a carneiros. Só uma vez, em 1918, foi possivel a THEILER uma reprodução da doença em condições climatericas especialissimas. Muito mais felizes do que os pesquisadores da Africa do Sul, pudemos reproduzir os sintomas da doença, com regularidade, e realizar uma experiencia na obscuridade (bovino n.º 9), o que contribuiu para demonstrar de maneira definitiva que o sól é um fator indispensavel na produção de todos os sintomas da doença.

Uma outra questão de consideravel importancia pratica e tambem teorica é saber se o fator letal do *Holocalyx* (acido cianidrico) é tambem o responsavel pela ação fotodinamica observada pela injes-

tão cronica da planta. A principio tinhamos imaginado que esse fator altamente toxico produzisse lesões hepaticas com retenção de bile. O acumulo da filoeritrina, corante fluorescente e fotosensibilizante excretado pela bile, sensibilizaria os tecidos á luz e seria então responsavel pelo desencadeamento de uma segunda fase da doença, caracterizada por graves fenómenos de fotosensibilização. As experiencias realizadas com o proprio *Holocalyx* mostraram entretanto, de maneira muito nitida, que os sintomas de fotosensibilização precedem a ictericia, parecendo ser esta ultima antes um efeito do que a causa da primeira. Um fato curioso e que foi sempre observado, é que alguns minutos depois da administração do "Alecrim", o animal acusa frequentemente uma fotofobia que se traduz por energico pinçamento das palpebras.

A experiencia com o bovino n.º 8, em que pela administração intensiva e cronica de cianeto de potassio, pudemos observar ao fim de 23 dias um dos sintomas mais tipicos da doença: hemorragias localizadas no tecido subcutaneo e preferencialmente na barbela, nas axilas e virilhas, é um indicio forte de que o acido cianidrico por si mesmo pode sensibilizar o animal á luz. A experiencia n.º 9, realizada no escuro, e em que foram administradas grandes doses de "Alecrim" (portanto de acido cianidrico) sem que se observasse nenhum sinal de hemorragias subcutaneas ou peritoneais, mostra que aquela ação hemorragica não pode correr unicamente por conta do acido cianidrico.

Por que mecanismo o acido cianidrico poderia sensibilizar bovinos á luz?

O efeito do acido cianidrico foi varias vezes pesquisado em relação á ação fotodinamica. Nós mesmos, em companhia de O. Bier, estudámos em 1934 o efeito reforçador do cianeto na hemolise fotodinamica. Em 1937 estudámos o efeito do acido cianidrico na oxidação pela eosina irradiada, do sôro parcialmente ativo. Chegámos então á seguinte conclusão: "O sôro fresco de cavalo possue um principio protetor contra o efeito oxidante da eosina irradiada. Esse principio protetor, termolabil, é tornado parcialmente inativo pela adição de HCN m/50".

Esse trabalho, realizado naquela época como uma tentativa para esclarecer o mecanismo da ação fotodinamica, permitirá talvez aprofundar o mecanismo da fotosensibilização de bovinos por uma planta cianogenetica. Os herbivoros possuem em circulação e nos tecidos, em doses subtoxicas, uma substancia fluorescente e fotosensibilizante, a filoeritrina, derivada da clorofila. O papel do acido cianidrico poderia consistir em fazer baixar o limiar de toxidez dessa substancia, prova-

velmente inhibindo aquele principio protetor a que nos referimos em 1937 a respeito da oxidação do sôro pela eosina irradiada. Pelo menos, no momento, parece-nos ser essa a explicação mais satisfatoria para esse surpreendente fenomeno de fotosensibilização desencadeado pelo *Holocalyx glaziovii.*

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos profs. H. da Rocha Lima e H. Embden a critica construtiva e sugestões de novas experiencias que foram muito uteis na elaboração do presente trabalho. Agradecemos ao prof. F. Rawitscher que nos acompanhou numa das excursões á Fazenda Guanabara e cuja intervenção foi decisiva na exclusão de plantas conhecidamente fotosensibilizantes. Agradecemos ao Snr. A. de Moura Andrade o ter proporcionado condução, estadia e facilidade de estudo na sua fazenda em Andradina. Agradecemos ao Dr. Souza Mariz, do Circulo Italiano de Campinas, a realização das reações de Van den Bergh no sôro dos bovinos em experiencia. Agradecemos aos Drs. J. Moreira, A. M. Penha, V. Grieco e E. Trapp as informações preciosas de antigas autopsias realizadas na Fazenda Guanabara em 1936 e 37. Agradecemos ao Dr. Paulo Bueno, que nos auxiliou em algumas das autopsias e realizou os exames microscopicos referidos no trabalho. Finalmente, ao nosso auxiliar Snr. Mario Amaral, pela eficiencia demonstrada durante a realização das experiencias acima referidas.

## PHOTOSENSITIZATION IN CATTLE

### A DISEASE PRODUCED BY *Holocalyx glaziovii* TAUB.

*Abstract*

*This paper deals with the study of a terrible disease of photosensitization in cattle appearing in some pastures in the Northwestern region of the State of São Paulo (Andradina). In these regions, after the destruction of extensive areas of forests and before the development of the grass, the only food available for cattle consists of the green sprouts from the little trunks of trees still alive. The disease is definitely associeated to the injestion of a cyanogenetic, highly toxic leguminous plant Holocalyx glaziovii* TAUB. *It is a tree very common at the sites in which the disease naturally occurs. In the new formed pastures the plant presents itself under the form of trunks cut near the ground, growing strongly green in September and October. Just at this time the disease appears. After the heavy rains of November, the disease becomes more and more rare and finally disappears, the grass being at this time luxuriantly developed.*

*The high mortality (about 1.000 animals in six years) shows that the disease is an important economic matter, causing heavy losses to cattle raisers of these regions. It presents symptoms somewhat similar to those of Geeldikkop. At the first stage, the animals present extensive swellings of the skin specially localized at the ears,*

*dewlap and some exposed regions of the body. Extensive necrosis of the skin occurs in the chronic cases, succeeding disappearance of the subcutaneous edemae. The sites of appearance of such scars are also preferential, being almost always the ears, dewlap, outward part of the thighs and the regions of the belly nears axils and groins. Sometimes all the lateral and most exposed regions of the body may be mummified. When the animal is dark with white spots, the lesions are specially localized at the white sites of the skin. At the final stage the animal presents a miserable appearance.*

*Death occurs more frequently at the stage of swelling and beginning of skin necrosis. Autopsy shows large subcutaneous hemorrhages localized specially at the same sites in which the edemae and scars of the skin occur, hemorrhages in the peritoneum and walls of the gastro-intestinal tract. Considerable icterus, accompanied by thickening of the bile to the consistency and appearance of strawberry jelly, has been always observed. Fatty degeneration of the liver, with necrosis of the centre of the hepatic lobules, have been observed microscopically. Severe lesions of the eyes have been observed in some cases.*

*The fact that the lesions occur principally in the most exposed areas of the skin and specially in the white spots, has led to the diagnostic of photosensitization. By drenching calves with aqueous extracts of Holocalyx glaziovii we reproduced experimentally all the lesions and symptoms of the disease. In this way we have been able to draw a picture of the evolution of the disease: the symptoms of photosensitization, as photophobia, abundant secretion of tears, polypnea and panting start very soon, during the first week of continued administration of plant extracts. Before any sign of extrinsic or intrinsic (Van den Bergh reaction in the blood serum) icterus these signs of severe photosensitization have been observed. Even after extensive hemorrhages may be detected by autopsy, no icterus is obseved. Icterus, thickening of the bile and severe lesions of the liver, as well as peritoneal and gastro-intestinal hemorrhages, are symptoms of the final stage of the chronic poisoning by Holocalyx. Finally, extensive necrosis of the exposed skin succeed these subcutaneous hemorrhages and seem to be their immediate consequence. The localization and appearance of these hemorrhages and lesions closely agree with those observed under field conditions.*

*The final demonstration that the production of all symptoms depends on a combined action of the plant and sunlight has been made by continually drenching a calf with Holocalyx, during 31 days, in a dark stable, without the appearance of any symptom.*

*Some evidence has been obtained that HCN itself is responsible for the photosensitization of animals fed on Holocalyx. Some cases referred to in the literature dealing with photosensitization produced by other cyanogenetic plants, as Sudan grass (see* HOWARTH, *1930) and clover, may constitute evidences favorable to the above assertion. As a matter of fact we have obtained in a calf which received repeatedly (during 23 days) daily toxic doses of KCN, hemorrhages localized subcutaneously at the same sites where the lesions in the natural disease appear. It is also extremely interesting that strong signs of photophobia appear 10 or 15 minutes after drenching calves with Holocalyx, as well as after the administration of cyanide.*

*A tentative explanation for this capacity of HCN to produce photosensitization in cattle, has been proposed by assuming that it strengthens the photodynamic action of the naturally occurring phylloerythrin, present in the tissues of this animal group. Under the action of cyanide the "normal" amount of this phototoxic substance would be rendered toxic, producing the effects observed in cattle after administration of the cyanogenetic plant Holocalyx glaziovii.*

*Experiments on the action of cyanide determining an increase in the photodynamic effects of eosin, haematoporphyrin and rose bengale, have been described in several instances.* WOHLGEMUTH & SZORENYI *(1933) demonstrated that HCN m/300 increases the uptake of $O_2$ by tissues sensitized with rose bengale and hematoporphyrin, as well as the transformation of hemoglobin to methemoglobin under the combined action of rose bengale and light. Since the photodynamic phenomenon is an assentially oxidative one, the comsumption of $O_2$ really represents the intensity of it.* BIER & ROCHA E SILVA *(1935) described the increasing effect of cyanide m/500 in the photodynamic hemolysis produced by eosin and more recently (1937) we have shown that HCN m/50 produced an increase in the consumption of $O_2$ by horse serum sensitized with eosin and exposed to light. From these last experiments we were led to the following conclusion: "HCN m/50 has no influence on the photoxidation of inactive serum, produced by eosin. The photooxidation of the partially active serums, however, is strongly influenced by HCN m/50. In some of the experiments this concentration of HCN increased by more than 50% the oxidating power of irradiated eosin".*

*I believe these facts might provide a basis for the explanation of that naturally occurring photosensitization on cattle produced by a cyanogenetic plant Holocalyx glaziovii.*

———o———



Fig. *A* — No centro da fotografia, grande quantidade de *Solanum viarum* (mat. n.º 4). O capim ainda sêco ou muito pequeno.



Fig. *B* — Mesmo local da fig. *A*, um mês depois. Póde-se observar o grande desenvolvimento atingido pelo capim.



Fig. *C* — Aspecto de uma queimada recente.



Fig. *D* — Um toco de arvore brotando intensamente (mat. n.º 2) num dos pastos onde desencadeou a doença em 1939.



Fig. *E* — Caso I. O animal exposto ao sol mostrava forte blefaroespasmo e respiração ofegante *(panting)* e até 130 respirações por minuto.

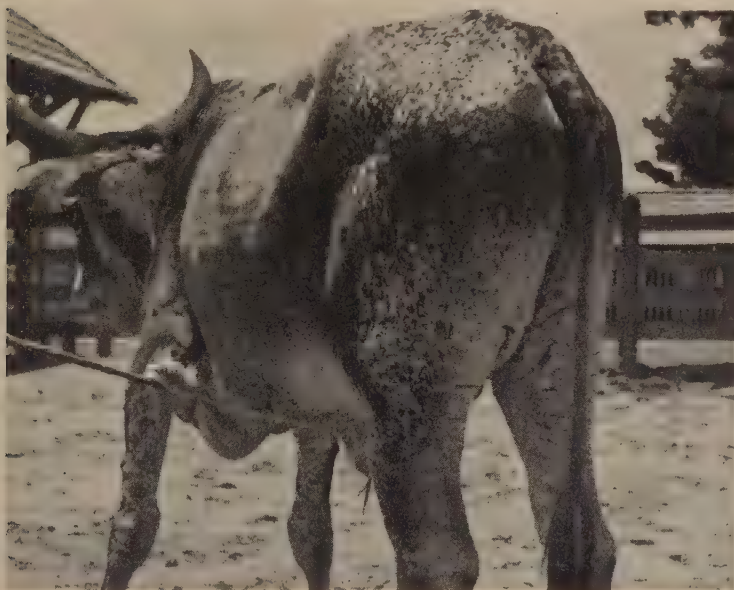


Fig. *F* — Caso I. Lesões necroticas nas partes posteriores das pernas e axilas.



Fig. *G* — Caso observado em 1936 pelo Dr. J. Moreira. Notar a localização das lesões cutaneas nas partes claras da péle.



Fig. *H* — Caso observado em 1936, pelo Dr. J. Moreira. Apresenta forte edema da papada e lacrimejamento abundante.



Fig. *I* — Caso II. Inicio da segunda fase da doença. O animal externamente se apresenta emagrecido e sem edemas subcutaneos.



Fig. *J* — Mesmo animal da Fig. *K*. Esfoliação e rachaduras da barbela. Fase final da doença; animal convalescente.



Fig. *K* — Mesmo animal da fig. *J*. Rachaduras da péle em casca de arvore sêca, na parte posterior das pernas.



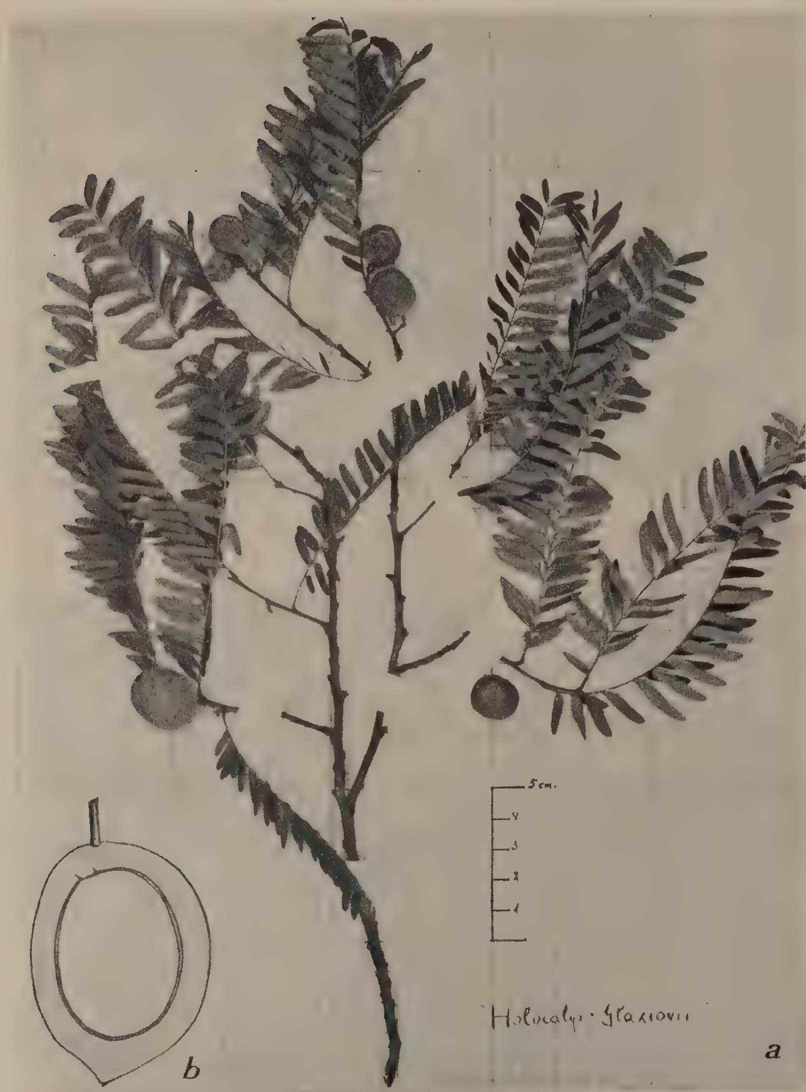
Fig. *L* — Toda a parte dorsal da péle necrosada. Queimaduras localizadas na parte superior das ancas. Mesmo animal da fig. *O*



Fig. *M* — Caso III. Necrose sêca com descamação intensa. Animal em franca convalescença



Fig. *N* — Mesmo animal das figuras *I* e *J*. Orelha necrosada, onde se implantaram infecções secundarias.




*a* — Um ramo da planta *Holocalyx glaziovii* TAUB, o "Alecrim".
*b* — Detalhe do fruto (corte longitudinal, segundo PIO CORRÊA)



Fig. *O* — Mesmo animal da fig. *L*. Conjuntivite purulenta com lacrimejamento abundante.



Fig. *P* — Bovino n.º 5, submetido a experiencia de alimentação cronica com o "Alecrim", na Fazenda Mato Dentro, em Campinas. Toda a região escura, na péle, corresponde a uma necrose sêca. Em certos pontos nota-se o lugar de escaras que se desprenderam.



Bovino n.º 5. Antes da autopsia (24-12-39). Extensas rachaduras da péle (com o aspecto típico de casca de arvore sêca). Note-se que a parte inferior do abdomem se apresenta com um aspecto normal.



Bovino n.º 5. Outro aspecto das rachaduras da péle na região da axila e regiões laterais do pescoço.

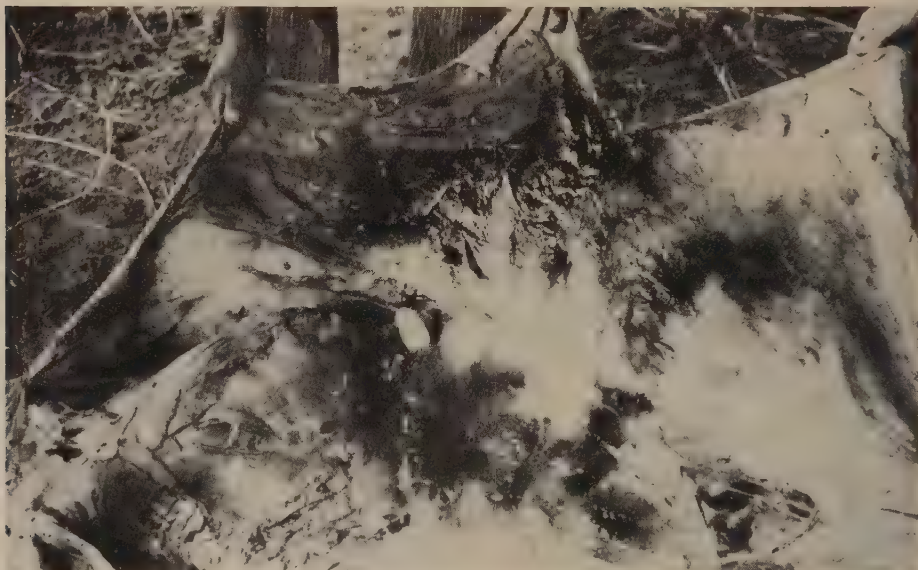


Fig. *Q* — Região axilar. Póde-se ver um ganglio poupado pelo processo hemorragico.

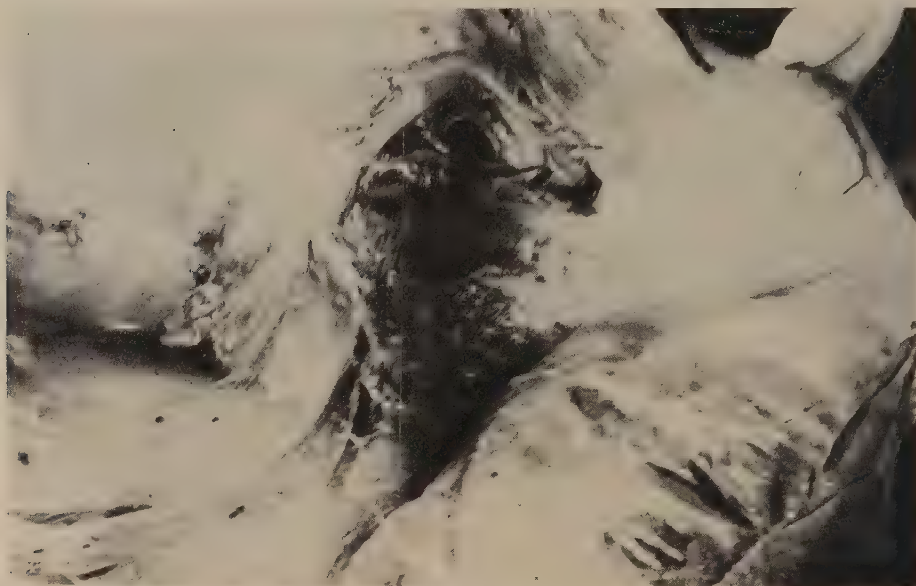


Fig. *R* — Forte hemorragia na virilha.

Figs. *Q* e *R* — Bovino n.º 6. Extensas hemorragias localizadas de preferencia nas regiões das ancas, axilas e virilhas, bem como na parte superior do dorso e papada.



Fig. *S* — Bovino n.º 2. Experiencia realizada na Fazenda Guanabara. Panoftalmo e lacrimejamento intenso.



Fig. *T* — Bovino n.º 5. Fotofobia, alguns minutos depois de uma administração do "Alecrim" (17-XII-1939)



Fig. *U* — Bovino n.º 6. Pinçamento das palpebras, 10 minutos depois de uma administração de "Alecrim" (10-I-40).

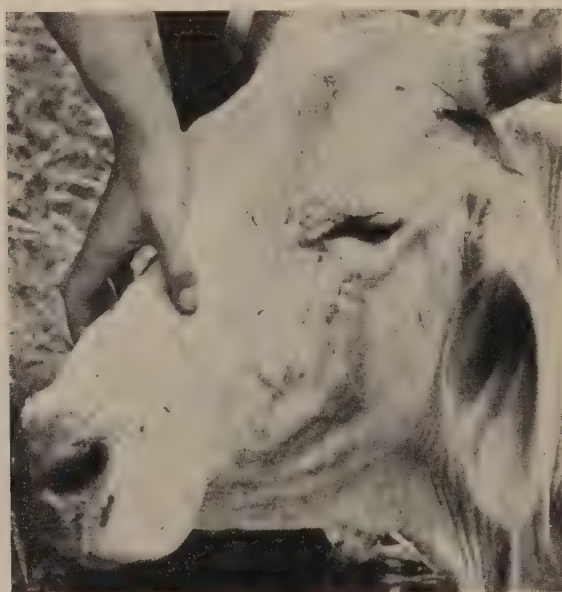


Fig. *V* — Bovino n.º 6. Outro aspecto da fotofobia depois de uma das administrações do "Alecrim" (10-I-40)

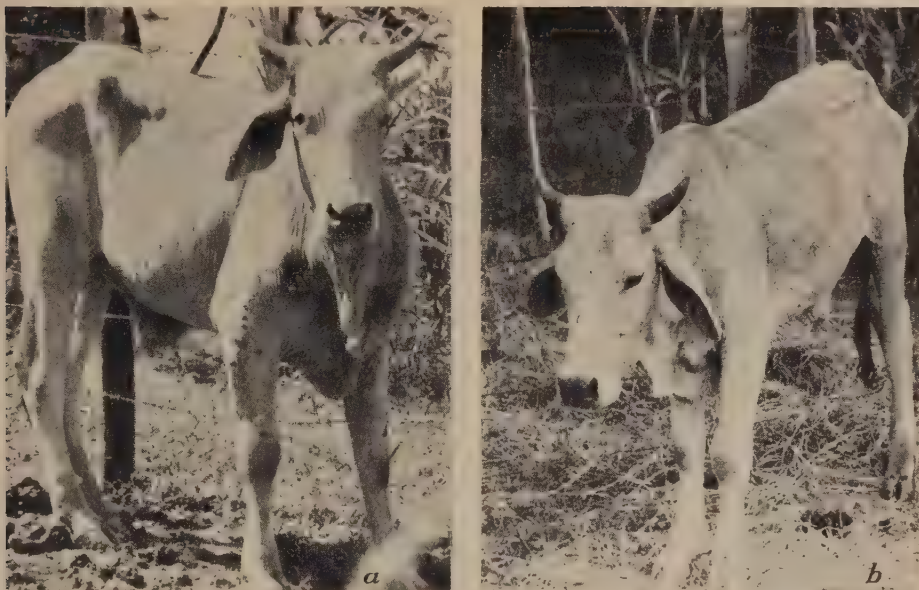
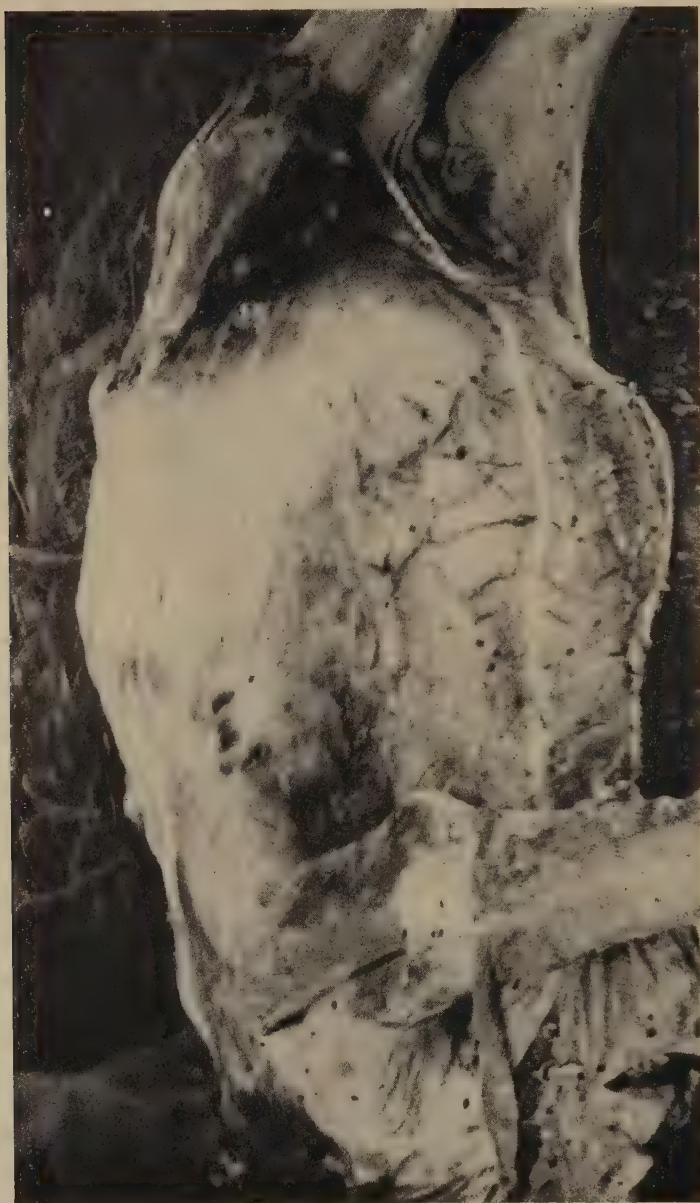



Fig. *X* — Bovino n.º 6 *(a)* Aspecto do animal no começo da experiencia, no dia 29-12-39. *(b)* Aspecto do mesmo dois dias antes da morte. Note-se o aspecto miseravel apresentado então pelo animal.



Fig. *Z* — Bovino n.º 6. Póde-se ver nitida descamação na região lateral do abdomen. Quedas de pêlos na região da virilha e face lateral da coxa. E' êsse o aspecto inicial das lesões da péle. (Foto tirado no dia 16-1-40).

Arq. do Inst. Biologico, Vol. 11
Estampa 89



Bovino n.º 8. Hemorragias subcutaneas de localização preferencial na nuca, virilha e axila.

# ANTITOXINA TETANICA
## DOSAGEM NO SÔRO DE ANIMAIS VACINADOS

POR

C. Rodrigues e M. D'Apice

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com a descoberta da anatoxina tetanica e consequente desenvolvimento da vacinação contra o tétano, surgiram, como era de esperar, novos metodos de dosagem de antitoxina, partindo de pequenas quantidades de sôro, e permitindo evidenciar quantidades insignificantes de antitoxina. Só com o auxilio destes metodos foi possivel obter elementos mais ou menos seguros quanto ao grau da imunidade alcançada, e ao desenvolvimento de sua curva.

Dentre os varios processos até hoje propostos para esse fim, nenhum apresenta, a nosso ver, essas caracteristicas de precisão aliadas a uma grande economia de animais de experiencia, como o de KNERR e HOTTLE, 1934. Estes autores, dosando os sôros desconhecidos por comparação com uma antitoxina padronizada, estabeleceram com suficiente aproximação o conteudo antitoxico do sôro, usando para isso apenas duas cobaias e um centimetro cubico do sôro a dosar. Dessa maneira, foi-lhes possivel ainda determinar até concentrações de anticorpos tão extremamente reduzidas como um decimilesimo de unidade por centimetro cubico.

O metodo de KNERR e HOTTLE usa cobaias. Estabelece nestas o prazo da morte, consequente á inoculação de misturas de frações determinadas de toxina e antitoxina conhecidas. Dessa forma foi possivel encontrar uma dose de toxina tal que, misturada a 0.01 unidade de sôro, não é capaz de matar a cobaia no prazo de 96 horas, ao passo que, misturada a 0.0001 unidade de sôro, provoca a morte do animal aproximadamente em 40 horas. As misturas contendo quantidades intermediarias de sôro matam a cobaia em tempos igualmente intermediarios. A dose de toxina que a esses autores pareceu conveniente foi L+/250.

Para a dosagem propriamente, dos sôros desconhecidos, estes são juntados á dose de prova de toxina, e a mistura, inoculada em duas cobaias. Ao mesmo tempo faz-se uma segunda serie de comparação, usando-se misturas da dose de prova da toxina com quantidades variaveis da antitoxina conhecida. O confronto dos periodos de morte, da

serie conhecida com os da serie desconhecida, permite avaliar, com suficiente aproximação, o teor antitoxico do sôro a dosar.

Baseia-se portanto o metodo de KNERR e HOTTLE, na relação existente entre o excesso de toxina recebida e a sobrevivencia do animal inoculado.

Nas verificações referentes á curva de imunidade, em que se torna necessario efetuar numerosas dosagens do sôro, de cada um dos animais de grupos sempre grandes, o metodo acima descrito encontra sua maior aplicação.

No decurso de observações sobre a vacinação de muares, efetuadas na Limpeza Publica da Cidade de S. Paulo, julgámos interessante acompanhar a curva de imunidade, por meio de dosagens periódicas do sôro de alguns dos animais observados. Aproveitando esta oportunidade, procurámos tambem estabelecer um metodo de dosagem simples e economico, que nos permitisse, então e para o futuro, executar as dosagens em grande escala exigidas por este tipo de verificações. Fixámo-nos portanto no metodo de KNERR e HOTTLE.

Infelizmente, no momento o numero de cobaias disponiveis em nosso serviço éra insuficiente, mesmo para verificações economicas como a que este processo nos faculta. Dispondo, entretanto, de um numero um pouco mais elevado de camondongos, e dada a maior facilidade de se manterem grandes criações destes roedores, procurámos adaptar o metodo a esta especie, seguindo aliás uma sugestão dos proprios autores.

Em nossas experiencias foram utilizados, portanto, camondongos suiços, albinos.

A toxina utilizada, TM 17 IIb, era uma toxina seca, obtida em 1930 e precipitada pelo sulfato de amonio. A DLM desta toxina é atualmente um pouco menor que 0mg,001, e o seu L+ é egual a 0mg,3, correspondendo portanto, aproximadamente, a 300 DLM por L+. Por ocasião do preparo a DLM era um pouco menor que 0mg,0005, e o L+ medía 0mg,24, ou sejam aproximadamente 480 DLM por L+.

A antitoxina padrão utilizada foi a do Laboratorio de Higiene de Washington, glicerinada, contendo 5 unidades em cada centimetro cubico. Foi sempre usada a partida n.º 63.

A determinação, em camondongos, do valor protetor do test-dose cobaia desta antitoxina (0,1 unidade) e de frações deste test-dose, contra o L+ da toxina TM 17 IIb, e frações correspondentes, forneceu os resultados reunidos na Tabela 1. Pela apreciação destes resultados já se pode ter uma impressão favoravel da exatidão do metodo de KNERR e HOTTLE, mesmo quando aplicado a camondongos.

TABELA 1

Neutralização de frações do limite morte de toxina, por frações de unidade americana de antitoxina

| Toxina (1) | Correspondencia proporcional em unidades americanas | Resultado atual da dosagem em camondongo, dado em frações de unidade antitoxica. | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Excesso de sôro | Equilibrio | Excesso de toxina |
| L+/2 | 0,05 | 0,056 | | 0,042 |
| L+/2 | 0,05 | 0,066 | | 0,044 |
| L+/2 | 0,05 | 0,067 | | 0,044 |
| L+/5 | 0,02 | 0,016 | | 0,0065 (2) |
| L+/6 | 0,0166 | | | 0,01 |
| L+/8 | 0,0125 | 0,013 | | |
| L+/10 | 0,01 | 0,02 | | 0,013 |
| L+/10 | 0,01 | 0,0065 | | 0,0025 (2) |
| L+/12 | 0,0083 | 0,013 | ±0,088 | 0,0059 |
| L+/12 | 0,0083 | 0,018 | ±0,012 | 0,002 |
| L+/24 | 0,0042 | 0,0059 | | 0,0038 |
| L+/32 | 0,0031 | 0,0038 | | 0,0026 |
| L+/50 | 0,002 | 0,0026 | ±0,0017 | 0,0011 |
| L+/60 | 0,0016 | 0,0026 | ±0,0017 | 0,0011 |

(1) Quando a mesma fração de toxina é representada mais de uma vez, cada vez corresponde a uma serie de experiencias.
(2) Nesta dosagem não se tomaram as precauções anotadas no testo.

Por experiencias previas, preocupámo-nos em encontrar uma dose de toxina tal que, pelo desenvolvimento do quadro morbido e pelo prazo de morte, pudesse indicar diferenças variando entre 0.1 e 0.0005 unidade antitoxica americana, no teor dos sôros a ela misturados.

Com o intuito de obter indicações ainda mais precisas, resolvemos prolongar o tempo de observação durante 6 dias, e considerar tambem, embora em caracter secundario, o aparecimento dos primeiros sintomas e a evolução destes.

A técnica seguida obedeceu, em linhas gerais, á aconselhada por Rosenau & Anderson para a dosagem de sôros antitetânicos. As diluições de sôro e de toxina eram feitas em agua fisiológica.

Para evitar, tanto quanto possivel, a ação da luz e da oxidação sobre a toxina, esta era pesada e dissolvida o menor tempo possivel antes do preparo da mistura; na obtenção da solução evitava-se qualquer

arejamento desnecessario. Logo depois de preparada e convenientemente agitada, a mistura era aspirada numa seringa, permanecendo então em relativo abrigo quanto á luz e ao ar, até o momento da inoculação. Com esta pratica, introduzida depois de duas experiencias preliminares, foi-nos possivel obter resultados muito mais constantes.

Após um intervalo que variou entre 30' e 90', devido a perdas de tempo decorrentes das inoculações, as misturas eram injetadas subcutaneamente, na raiz da cauda dos camondongos, na dose de 0.2 cc. Sendo o volume original sempre 1 cc. cada camondongo recebia portanto uma quinta parte dele.

Nas primeiras provas efetuadas, para seleção de uma dose toxica conveniente, já ficara demonstrada a impossibilidade de se obter, com uma unica dose da toxina por nós usada, uma escala suficientemente longa para nos permitir observar, no prazo de 6 dias, diferenças que caracterizassem quantidades de antitoxina, variando dentro dos limites que nos interessavam.

Estas provas estão representadas na tabela 2, e demonstram que para neutralizar 0.1 unidade de sôro e ainda provocar no camondongo lesões aparentes, dentro do prazo de observação indicado, não basta uma quantidade de toxina igual a L+/5. Por outro lado, os animais que recebem quantidades muito pequenas de sôro morrem todos ao mesmo tempo.

Por esse motivo, experimentámos utilizar duas doses de prova da toxina, uma das quais destinada a medir sôros que tivessem entre 0.1 e 0.01 unidade antitoxica, a outra para dosar os sôros entre 0.01 e 0.001. A tabela 3 mostra que, ainda neste caso, não é possivel obter uma diferenciação nitida.

Foram então experimentadas três doses toxicas de prova, a saber: L+/2, L+/12 e L+/60. A primeira para medir sôros entre 0.1 e 0.02 unidade, a segunda para 0.02-0.004, e a terceira para 0.004-0.001 unidade. De acordo com a tabela 4, verifica-se que é possivel, dessa maneira, dosar sôros contendo entre 0.1 e 0.001 unidade antitoxica por centimetro cubico. A dosagem deve ser feita pondo o sôro desconhecido contra L+/12, e, de acordo com o resultado, provando-se novamente, contra uma das duas outras concentrações de toxina.

A variabilidade de reação entre os camondongos é bastante grande, e nem sempre corresponde a variações de peso, como pode ser observado pelo exame das tabelas; por isso torna-se necessario empregar no minimo tres animais para cada prova. Em nossas experiencias, empregamos ora dois, ora três, ora quatro.

TABELA 2

Determinação da dose de prova da toxina

**1.ª verificação**

| Antitoxina, em unidades americanas | Toxina | Evolução dos sintomas nos 3 camondongos inoculados: 1.º | Peso | 2.º | Peso | 3.º | Peso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 | L+/5 | o | — | o | — | o | — |
| 0.1 | L+/10 | o | — | o | — | o | — |
| 0.1 | L+/15 | o | — | o | — | o | — |
| 0.1 | L+/20 | o | — | o | — | o | — |
| 0 001 | L+/5 | +57 h. | 19 gr. | +40 h. | 17 gr. | +30 h. | 16 gr. |
| 0.001 | L+/10 | +34 h. | 18 gr. | +32 h. | 17 gr. | +23 h. | — |
| 0.001 | L+/15 | +72 h. | 18 gr. | +74 h. | 17 gr. | +55 h. | 18 gr. |
| 0.001 | L+/20 | +72 h. | 16 gr. | +66 h. | 17 gr. | +56 h. | 16 gr. |

**2.ª verificação**

| Antitoxina, em unidades americanas | Toxina | Evolução dos sintomas nos 4 camondongos inoculados: 1.º | Peso | 2.º | Peso | 3.º | Peso | 4.º | Peso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 | L+/5 | o | 18 gr. | o | 24 gr. | — | — | — | — |
| 0.04 | | o | 22 gr. | o | 21 gr. | l. c. | 15 gr. | l. c. | 18 gr. |
| 0.016 | | o | 18 gr. | l. c. | 17 gr. | l. c. | 13 gr. | c. | 12 gr. |
| 0.0065 | | +69 h. | 15 gr. | — | — | — | — | — | — |
| 0.0025 | | +24 h. | 16 gr. | +30 h. | 10 gr. | +36 h. | 21 gr. | +54 h. | 13 gr. |
| 0.001 | | +24 h. | 14 gr. | +24 h. | 16 gr. | +24 h. | 16 gr. | +35 h. | 14 gr. |
| 0.1 | L+/10 | o | 22 gr. | o | 17 gr. | o | 17 gr. | — | — |
| 0.04 | | l. c. | 22 gr. | l. c. | 16 gr. | l. c. | 16 gr. | l. c. | 15 gr. |
| 0.016 | | o | 18 gr. | l. c. | 18 gr. | l. c. | 18 gr. | l. c. | 17 gr. |
| 0.0065 | | c. c. | 21 gr. | c. c. | 16 gr. | +117h. | 18 gr. | — | — |
| 0.0025 | | +34 h. | 11 gr. | +45 h. | 12 gr. | +45 h. | 17 gr. | +69 h. | 18 gr. |
| 0.001 | | +30 h. | 13 gr. | +30 h. | 15 gr. | +34 h. | 14 gr. | +45 h. | 15 gr. |

Legenda: O = ausencia de sintomas até 144 horas; l.c., c., cc., sintomatologia progressiva; + morte.
NOTA: — Nestas provas, não foram tomadas as precauções especiais descritas no testo.

TABELA 3

Determinação da dose de prova de toxina com 2 doses

| L+/2 | | | | | | | L+/6 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Antitoxina em unidades americanas | Evolução dos sintomas nos 3 camondongos inoculados | | | | | | Antitoxina em unidades americanas | Evolução dos sintomas nos 3 camondongos inoculados | | | | | |
| | 1.º | Peso | 2.º | Peso | 3.º | Peso | | 1.º | Peso | 2.º | Peso | 3.º | Peso |
| 0.1 | o | 17 g. | o | 12 g. | o | 14 g. | 0.01 | + 60 h. | 15 g. | + 88 h. | 16 g. | + 84 h. | 18 g. |
| 0.075 | o | 13 g. | o | 20 g. | — | — | 0.0075 | + 45 h. | 19 g. | + 60 h. | 16 g. | + 60 h. | 14 g. |
| 0.056 | l. c. | 17 g. | o | 15 g. | o | — | 0.0056 | + 36 h. | 15 g. | + 42 h. | 19 g. | + 60 h. | 18 g. |
| 0.042 | + 45 h. | 18 g. | + 60 h. | 21 g. | + 84 h. | 15 g. | 0.0042 | + 33 h. | 16 g. | + 45 h. | 18 g. | + 60 h. | 24 g. |
| 0.032 | + 39 h. | 15 g. | + 60 h. | 17 g. | + 60 h. | 14 g. | 0.0032 | + 36 h. | 18 g. | + 36 h. | 17 g. | + 42 h. | 14 g. |
| 0.024 | + 24 h. | 17 g. | + 36 h. | 22 g. | + 60 h. | 13 g. | 0.0024 | + 33 h. | 20 g. | + 60 h. | 14 g. | + 60 h. | 19 g. |
| 0.018 | + 21 h. | 20 g. | + 24 h. | 16 g. | + 30 h. | 20 g. | 0.0018 | + 36 h. | 16 g. | + 45 h. | 19 g. | + 45 h. | 28 g. |
| 0.013 | + 21 h. | 16 g. | + 27 h. | 16 g. | + 60 h. | 16 g. | 0.0013 | + 27 h. | 16 g. | + 39 h. | 14 g. | + 60 h. | 24 g. |
| 0.01 | + 21 h. | 17 g. | + 33 h | 17 g. | + 45 h. | 17 g. | 0.001 | + 30 h. | 19 g. | + 36 h. | 17 g. | + 60 h. | 16 g. |

**Legenda:** O = ausencia de sintomas até 144 horas; l.c., c.c., sintomatologia progressiva; + morte.

Pelo exame da tabela 4 e subsequentes, verifica-se que a simples notação do prazo de morte não é suficiente em todos os casos, como indice da proteção conferida; é necessario tambem, principalmente em situações como a nossa, em que houve necessidade de serem utilizados camondongos de varios pesos, levar em consideração o aparecimento dos primeiros sintomas e a sua evolução ulterior.

Nas tabelas 5 e 6 é apresentado um exemplo de dosagem, efetuada de acordo com este metodo. Nesta dosagem, substituimos as doses de prova de toxina iguais a L+/12 e L+/60 por L+/10 e L+/50, que nos pareceram ainda mais favoraveis.

E' possivel que pelo uso de toxinas pobres em toxoide, cuja importancia já foi ressaltada por ISTRATI em 1938, se consiga obter resultados ainda mais favoraveis e com um menor numero de doses de prova.

TABELA 4

Determinação da dose de prova da toxina, com 3 doses

| Toxina | Antitoxina em unidades americanas | 18h. | 24h. | 30h. | 36h. | 42h. | 48h. | 54h. | 60h. | 66h. | 72h. | 78h. | 84h. | 90h. | 96h. | 102h. | 120h. | 144h. | Peso em gramas dos camondongos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,1 | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | 0,066 | o | o | o | o | o | lc | lc | o | lc | lc | lc | lc | o | o | o | o | o | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | 0,044 | lc | lc | c | cc | cc | †45h. | | | | | | | | | | | | 17,5 |
| L+/2 | | o | lc | lc | cc | cc | cc | †54h. | | | | | | | | | | | 14 |
| | | o | o | lc | lc | c | c | c | cc | †66h. | | | | | | | | | 16 |
| | 0,03 | c | cc | †27h. | | | | | | | | | | | | | | | 18 |
| | | lc | cc | †30h. | | | | | | | | | | | | | | | 11 |
| | | lc | c | cc | cc | q.m. | q.m. | †51h. | | | | | | | | | | | 15 |
| | 0,02 | c | †24h. | | | | | | | | | | | | | | | | 12 |
| | | c | q.m. | †27h. | | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| | | lc | c | cc | cc | q.m. | q.m. | †54h. | | | | | | | | | | | 20 |
| | 0,02 | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | 0,013 | o | o | o | o | lc | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | — |
| | | o | o | o | o | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | lc | — |
| | 0,0088 | o | c | c | cc | cc | ccc | †54h. | | | | | | | | | | | 14 |
| L+/12 | | o | lc | lc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | †90h. | | | | | 15 |
| | | o | lc | lc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | ccc | q.m. | †102h. | | | 14 |
| | 0.0059 | lc | cc | cc | cc | ccc | †45h. | | | | | | | | | | | | 21,5 |
| | | lc | cc | cc | cc | cc | q.m. | q.m. | q.m. | †66h. | | | | | | | | | 13 |
| | | lc | c | cc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | q.m. | q.m. | †78h. | | | | | | | 12 |
| | 0,0039 | lc | cc | †30h. | | | | | | | | | | | | | | | 14 |
| | | lc | cc | ccc | †36h. | | | | | | | | | | | | | | 18 |
| | | lc | cc | ccc | ccc | q.m. | †48h. | | | | | | | | | | | | 16 |
| | 0,0039 | o | o | o | o | lc | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| | 0,0026 | o | c | cc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | q.m. | †69h. | | | | | | | | 10 |
| | | o | c | c | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | q.m. | †132h. | 13 |
| | | o | lc | lc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | ccc | ccc | †144h | 15 |
| L+/60 | 0,0017 | o | c | c | cc | cc | cc | q.m. | †60h. | | | | | | | | | | 12 |
| | | o | lc | c | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | †120h. | | 14 |
| | 0,0011 | lc | c | cc | cc | cc | cc | ccc | ccc | q.m. | q.m. | †78h. | | | | | | | 9 |
| | | lc | c | c | cc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | q.m. | †96h. | | | | 14 |
| | | o | c | c | cc | cc | cc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | ccc | q.m. | †126h. | 15 |

Legenda: O = ausencia de reação; l.c., c., cc., ccc., q.m., sintomatologia progressiva; † morte.

TABELA 5

Exemplo de dosagem

A) Previa, usando L+/12 como dose toxica de prova

| Sôro | Quantidade | Evolução nos 3 camondongos inoculados com 1/5 da mistura | | | | | | | | | | | | | | | | | Peso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sôro americano padrão | 0.0133 U. A. | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 13 gr. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 17 gr. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 19 gr. |
| | 0.0088 unidade | o | o | o | o | o | o | l.c. | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | 16 gr. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | l.c. | l c. | l.c. | l.c. | l.c. | c | c | c | e | c | 16 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | l.c. | l:c. | c | c | c | 20 g. |
| | 0.0059 unidade | l.c. | c | cc | cc | ccc | q.m. | †54 horas | | | | | | | | | | | 9 g. |
| | | o | c | c | c | cc | ccc | ccc | ccc | q.m. | q.m. | q.m. | †88 horas | | | | | 144 hs. | 11 g. |
| | | o | c | c | c | c | cc | cc | cc | q.m. | q.m. | q.m. | q.m. | q.m. | q.m. | q.m. | q.m. | † | 14 g. |
| | 0.001 unidade | l.c. | cc | cc | ccc | †40 horas | | | | | | | | | | | | | 12 g. |
| | | o | c | cc | ccc | †42 horas | | | | | | | | | | | | | 12 g. |
| | | o | c | c | c | q.m. | †48 horas | | | | | | | | | | | | 18 g. |
| Muar 121 — 1.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | l.c. | c | c | c | †54 horas | | | | | | | | | | | 13 g. |
| | | o | o | o | l.c. | l.c. | c | c | †59 horas | | | | | | | | | | 15 g. |
| | | o | o | o | o | l.c. | c | c | cc | ccc | ccc | q.m. | †82 horas | | | | | | 11 g. |
| Muar 121 — 2.a Sang. | 0.5 c. c. | l.c. | c | c | cc | q.m. | †46 horas | | | | | | | | | | | | 16 g. |
| | | l.c. | c | c | cc | q.m. | q.m. | †48 horas | | | | | | | | | | | 9 g. |
| | | l.c. | c | c | c | ccc | ccc | ccc | ccc | q.m. | q.m. | q.m. | †85 horas | | | | | | 12 g. |
| Muar 121 — 3.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 10 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 9 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | — |
| Muar 2 — 1.a Sang. | 0 5 c. c. | cc | ccc | †27 horas | | | | | | | | | | | | | | | 11 g. |
| | | c | cc | q.m. | q.m. | †36 horas | | | | | | | | | | | | | 14 h. |
| | | c | cc | cc | q.m. | q.m. | †40 horas | | | | | | | | | | | | 11 g. |
| Muar 2 — 2.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 15 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 14 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 14 g. |
| Muar 2 — 3.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | l.c. | l.c. | c | cc | cc | cc | † 60 horas | | | | | | | | | 11 g. |
| | | o | o | o | c | cc | cc | cc | q.m. | q.m. | q.m. | † 85 horas | | | | | | | 10 g. |
| | | o | o | o | o | l.c. | c | c | c | c | ccc | ccc | ccc | ccc | q.m. | †109 horas | | | 9 g. |
| Muar 93 — 1.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | l.c. | † 36 horas | | | | | | | | | | | | | | 16 g. |
| | | o | o | o | † 36 horas | | | | | | | | | | | | | | 12 g. |
| | | o | o | o | l.c. | cc | † 45 horas | | | | | | | | | | | | 22 g. |
| Muar 93 — 2.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 16 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 15 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 14 g. |
| Muar 93 — 3.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 15 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 14 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 15 g. |
| Muar 268 — 1.a Sang. | 0.5. c. c. | † 18 horas | | | | | | | | | | | | | | | | | 11 g. |
| | | c | ccc | q.m. | q.m. | † 40 horas | | | | | | | | | | | | | 15 g. |
| | | l.c. | ccc | † 27 horas | | | | | | | | | | | | | | | 14 g. |
| Muar 268 — 2.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | o | o | o | o | o | o | c | cc | cc | cc | cc | cc | † 109 horas | | | 9 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | l.c. | c | c | c | c | c | c | c | c | 11 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | l.c. | l.c. | c | 11 g. |
| Muar 268 — 3.a Sang. | 0.5 c. c. | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 14 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 12 g. |
| | | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | o | 10 g. |
| Muar 22 — 1.a Sang. | 0.5 c. c. | l.c. | c | ccc | † 36 horas | | | | | | | | | | | | | | 14 g. |
| | | l.c. | l.c. | c | cc | † 40 horas | | | | | | | | | | | | | 17 g. |
| | | o | o | c | c | cc | ccc | q.m. | q.m. | † 63 horas | | | | | | | | | 16 g. |
| Muar 22 — 2.a Sang. | 0.5 c. c. | o | c | c | c | ccc | q.m. | † 50 horas | | | | | | | | | | | 12 g. |
| | | o | l.c. | l.c. | c | c | cc | ccc | q.m. | q.m. | q.m. | † 70 horas | | | | | | | 16 g. |
| | | o | o | o | c | c | c | cc | ccc | q.m. | q.m. | q.m. | † 85 horas | | | | | | 13 g. |
| Muar 22 — 3.a Sang. | 0.5 c. c. | c | c | q.m. | † 36 horas | | | | | | | | | | | | | | 10 g. |
| | | l.c. | l.c. | ccc | † 36 horas | | | | | | | | | | | | | | 12 g. |
| | | l.c. | c | ccc | ccc | q.m. | q.m. | † 50 horas | | | | | | | | | | | 13 g. |
| Prazo | | 18h. | 24h. | 30h. | 36h. | 42h. | 48h. | 54h. | 60h. | 66h. | 72h. | 78h. | 84h. | 90h. | 96h. | 108h. | 120h. | 144h. | |

Legenda: l.c., c., cc., ccc., qm = sintomatologia progressiva. + = morte.

TABELA 6

Exemplo de dosagem

B) Definitiva, usando L+/2 como dose toxica de prova

| Sôro | | Quantidade | Evolução nos 3 camondongos inoculados com 1/5 da mistura | Peso |
|---|---|---|---|---|
| Padrão americano | | 0.067 unidade | o o o o o o o o o o o o o o o o o | 10 gr. |
| | | | o o o o o o o o o o o o o o o o o | 11 gr. |
| | | 0.044 unidade | o c c q.m. q.m. q.m. † 54 h. | 8,5 » |
| | | | o c c cc cc ccc † 56 h. | 8,5 » |
| | | | o lc c cc cc ccc ccc q.m. † 66 h. | 9 » |
| | | 0.03 unid. | o lc c cc ccc † 51 h. | 23 » |
| | | 0.020 unidade | cc † 24 h. | 12 » |
| | | | c q.m. † 27 h. | 11 » |
| | | | c q.m. † 30 h. | 8 » |
| Muar 121 | 3.a Sangria | 0,5 cc | c ccc † 24 h. | 8 » |
| | | | c c q.m. † 27 h. | 10 » |
| Muar 2 | 2.a Sangria | 0,5 cc | o o o lc c c c c q.m. † 69 h. | 10 » |
| | | | o o o lc lc c c c q.m. † 69 h. | 9 » |
| | | | o o o o lc c c c c c c c cc † 93 h. | 13 » |
| Muar 93 | 2.a Sangria | 0,5 cc | lc c cc cc † 38 h. | 14 » |
| | | | lc c cc cc † 38 h. | 9 » |
| | | | lc c cc cc q.m. † 45 h. | 13 » |
| | 3.a Sangria | 0,5 cc | o o o o o o o o o o o o o o o o o | 15 » |
| | | | o o o o o o o o o o o o o o o o o | 12 » |
| | | | o o o o o o o o o o o o o o o o o | 12 » |
| Muar 269 | 2.a Sangria | 0,5 cc | † 16 h. | 12 » |
| | | | c † 24 h. | 16 » |
| | | | c q.m. q.m. q.m. q.m. q.m. † 54 h. | 9 » |
| | 3.a Sangria | 0,5 cc | lc † 24 h. | 8 » |
| | | | o c cc ccc † 38 h. | 9 » |
| | | | o c cc ccc † 38 h. | 14 » |
| Prazo . . . | | | 18h. 24h. 30h. 36h. 42h. 48h. 54h. 60h. 66h. 72h. 78h. 84h. 90h. 96h. 108h. 120h 144h. | |

Legenda: O = ausencia de reação; l.c., c., cc., ccc., q.m., sintomatologia progressiva. † morte.

## TETANUS ANTITOXIN.
## FILTRATION IN SERUM OF IMMUNIZED ANIMALS

*Abstract*

*The* KNERR *and* HOTTLE *method for evaluation on guinea-pigs of minute amounts of Tetanus antitoxin can be also applied to mice.*

*It is not possible to determine antitoxic values comprised between 0.1 and 0.001 A. U., against only one test-dosis of the Tetanus toxin that we have employed.*

*By the utilization of three different toxic test-dosis, we were able to cover this range.*

## BIBLIOGRAFIA

ISTRATI, K. — 1938 — Experimentelle Untersuchungen über aktive Tetanusimmunität. I. Eine Methode zur Messung kleiner Antitoxinmengen. *Zentr. f. Bakt., O,* 143, 106-119.

KNERR, R. P. & HOTTLE, G. A. — 1934 — Determination of minute amounts of tetanus antitoxin in serum. *Journ. Inf. Dis.,* 55, 360-362.



# PRIMEIROS RESULTADOS DAS EXPERIENCIAS DE COMBATE À BROCA DO ALGODOEIRO "GASTEROCERCODES BRASILIENSIS HAMBL." (COL. CURCUL.) (*) POR MEIO DE PULVERIZAÇÕES COM CALDAS ARSENICAIS

POR

H. F. G. Sauer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 90-95

## INTRODUÇÃO

Dentre as principais pragas do algodoeiro, a lagarta rosada e a broca são inquestionavelmente as que, de um modo geral, proporcionam maior soma de prejuízos. Todavia, nenhuma outra, tanto quanto esta, é motivo de tamanha preocupação nos meios interessados. A broca do algodoeiro, cuja constatação no Brasil data de mais de três décadas, tornou-se efetivamente praga de muita importância econômica, notadamente depois do incremento que teve a cultura do algodão. Desde os Estados do norte e nordeste do país, onde aparentemente só é representada por uma variedade do típico *Gasterocercodes brasiliensis* HAMBL. (3-4-5), que ocorre nos Estados centrais, os seus efeitos em qualquer região manifestam-se claramente.

No Estado de São Paulo os prejuízos constantes e progressivos que ocasiona, comuns mesmo quando as medidas profiláticas e de combate atualmente em uso são aplicadas com rigôr, constituem o principal argumento para considera-la como o inséto mais nocivo à cotonicultura.

Nas condições em que atualmente se processa a cultura, os danos provocados por essa praga já foram estimados, para São Paulo, em cerca de trinta mil contos de réis (2). Por informações cedidas gentilmente pelo Serviço Científico do Algodão, do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, em Campinas, e constantes de relatórios inéditos, oriundos de criteriosas experiências conduzidas por todas as regiões paulistas durante anos consecutivos, tivemos conhecimento de que as culturas plantadas mais cedo produzem geralmente uma colheita sensivelmente maior; o produto é por todos os modos de superior

---

(*) Estudos de COSTA LIMA, publicados em 1938, na Rev. Chacaras e Quintais, S. Paulo, 58 (4): 471, consideram o gênero *Gasterocercodes* PIERCE sinônimo de *Eutinobothrus* FAUST.

qualidade. Tais campos, com o número de plantas por vêzes reduzido de mais de 50%, deram comparativamente maior produção que outros, plantados mais tardiamente e cuja cultura não teve redução superior a 15%. Normalmente é a broca do algodoeiro que determina a quasi totalidade dessa redução, pois nos algodoais plantados cedo, por razões conhecidas a intensidade do ataque é tal que por vêzes dizima inteiramente a plantação. Motivado por este fator generalizou-se a prática do plantio mais tardio. Se forem, porém, encaradas as consequências menos vantajosas para a cultura e produção, advindas dessa medida, enfrentar-se-á um aspéto pouco considerado e que concorre para encarecer mais ainda a importancia econômica do *Gasterocercodes brasiliensis* HAMBL.

Conquanto os processos presentemente empregados contribúam para reduzir os prejuízos, nem sempre os resultados da sua aplicação são suficientemente satisfatórios. E' verdade que geralmente as praticas preconizadas são muito negligenciadas. Mas é comum, em casos onde se tomam as necessarias precauções, não se evidenciar claramente a eficácia de tais processos.

O combate químico à essa praga preocupa a atenção do autor desde 1937, quando foram feitos os primeiros ensaios. No entanto, até que ficasse devidamente esclarecida a biologia da praga, não era facil encetar, com maior segurança, outras investigações que visassem o seu combate. Essa a causa de não resultarem promissoras as primeiras tentativas. Depois dos estudos feitos por HAMBLETON, divulgados em 1937 (2), dos quais participamos como assistente, foram obtidas certas informações, que convenientemente encaradas, forneceram os elementos para uma nova diretriz e que, aplicados na presente safra, conduziram aos primeiros resultados satisfatórios na pratica.

O intuito do presente trabalho consiste em apresentar certas considerações sôbre a maneira por que o problema foi abordado, as razões dos tratamentos e comportamento da praga, bem como os primeiros resultados obtidos, à guiza de uma informação preliminar e sem carater definitivo.

Quando os colaboradores mostram-se realmente interessados na solução de um problema, a contribuição material facilita sobremodo o trabalho do investigador. O conjunto das experiências empreendidas demandou, em razão dos recursos disponíveis, esforços sòmente realizáveis em tão curto prazo devido à dedicação dos Snrs. BENEDITO LUZ RIBEIRO, J. RUBENS P. MACHADO, BENEVIDES SIQUEIRA e VALENTIM PAIOLA, aos quais consignamos os nossos agradecimentos.

Agradecemos também ao DR. DECIO S. AGUIAR, Chefe da Secção de Química, as análises dos inseticidas bem como ao DR. A. A. BITAN-

COURT, Subdiretor da Divisão Vegetal do Instituto Biológico, as sugestões sôbre a análise estatística dos dados obtidos.

## HISTORIA DA VIDA E HABITOS DA BROCA DO ALGODOEIRO

Para conveniência de exposição julgamos preferível, ao abordar êste capítulo, tomar como ponto de partida o comportamento dos adultos no período postcultural, e historiar em seguida as atividades da praga.

Já está definitivamente provado que uma elevada porcentagem de adultos é capaz de transpôr o inverno e motivar a infestação das novas plantações. Mesmo supondo que fossem eliminadas pelo arrancamento e queima dos restos culturais e limpeza dos campos, as condições favoráveis de sobrevivência, a restrição das atividades da praga nos meses frios, a possibilidade de alimentação em outras espécies vegetais, assim como a longevidade média de cerca de 200 dias, seriam suficientes para garantir a uma determinada população de brocas a sobrevivência a êsse período crítico. Como entretanto essa prática de combate é pouco considerada, os campos de cultura, além de manterem ótimas as condições de sobrevivência, ainda, em virtude das criações que aí se processam, concorrem para que a população de adultos que passam de uma para outra cultura seja incomparavelmente maior.

E' sabido que no fim da safra, praticamente 100% das plantas estão atacadas. Para ter-se uma idéia da população de formas do inseto que são abrigadas por tais algodoeiros, foram cuidadosamente examinados 500 caules retirados de uma área de 18.000 ms². Êsses caules foram arrancados em lotes de 100, de cinco locais distribuidos no algodoal plantado em começos de Novembro de 1939. A tabela 1 mostra os resultados e por ela poder-se-à notar a elevada população de adultos que ainda seria obtida, caso permanecessem no campo os restos culturais. Nesse exame não se levou em consideração o número de ovos, dada a dificuldade de serem contados; mas existiam em grandes quantidades.

De um modo geral, um alqueire comporta em média cerca de 60 mil algodoeiros. E como efetivamente no término da colheita praticamente 100% das plantas estão infestadas, tomando-se por base a média em questão, ter-se-ia uma população equivalente a cerca de 160 mil indivíduos em diferentes estádios, o que representa uma população próxima da realidade, dadas as condições comumente encontradas em São Paulo.

E' notavel a influência que a agua exerce na vida dos adultos de *G. brasiliensis* HAMBL. E quando as condições do local não são adequadas, ha uma migração para regiões de maior umidade. Já

por êsse motivo, já por causa da vegetação propícia à alimentação, os pastos, as beiradas de matos ou baixadas oferecem as condições necessárias. Sem duvida reside aí a razão por que o início do ataque nas culturas é mais frequente nas margens dos algodoais, e as baixadas comumente são mais afetadas.

TABELA 1

Número de indivíduos do *G. brasiliensis* HAMBL. em diferentes estádios encontrados em 500 caules de algodoeiros examinados em 17 de Maio de 1940 e retirados de área equivalente a 18.000 ms.², Campinas

| Estadio do indivíduo | N.º total | Médias em 100 caules | Porcentagem de caules sãos |
|---|---|---|---|
| Adultos . . . . . . . . | 153 | 30,6 | |
| Ninfas . . . . . . . . | 98 | 19,6 | |
| Prepupas . . . . . . . | 28 | 5,6 | |
| Larvas adultas . . . . | 194 | 38,8 | |
| Larvas médias . . . . | 655 | 131,0 | |
| Larvas pequenas. . . . | 237 | 47,4 | |
| | 1.365 | 273,0 | 1,8 |

Conquanto se supuzesse que o vôo tivesse intima relação com a sua disseminação, ante os insucessos das inúmeras experiências feitas, mantinha-se ainda essa hipótese, mas, em virtude da atividade do inséto, admitia-se mais facilmente a sua disseminação pelo caminhamento ou outros meios mais secundários para êsse caso. Isso porém não fornecia os elementos para uma conveniente explicação do seu aparecimento em certos sítios. Em Março passado, após praticamente cinco anos de tentativas, ficou constatado de maneira definitiva o vôo da broca. A dificuldade dessa observação decorria dos hábitos noturnos do adulto. Em 14 de Março, deixando certo número de indivíduos em uma caixa de petri, em ambiente escuro, porém não tanto que não permitisse verificar as atividades dos adultos, depois de muitos movimentos, principalmente ao redor do bordo da caixa, por período entre 45 e 90 minutos, a broca pára, toma posição típica do alçamento de vôo, abre vagarosamente as azas e brusca e rapidamente alça o vôo. Essa verificação contribuirá para modificar a idéia reinante quanto à propagação da praga, explicando satisfatóriamente a disseminação do inséto.

Quando surgem os novos algodoais, época em que tanto as condições do meio como as climáticas são muito favoraveis, em razão das condições adversas a que estavam submetidos por longo prazo os adultos são atraídos para a cultura, iniciando as atividades.

Como é facil de conceber, os algodoais plantados cedo são os primeiros atingidos, e como relativamente ocupam área menor, o volume de indivíduos que aí se condensa, sendo mais elevado, determina uma infestação muito forte, cujos efeitos nocivos ocasionam prejuízos muito severos, quando não dizimam inteiramente a cultura.

Na estampa 90, fig. *A* vêem-se os estragos ocasionados pela broca do algodoeiro num campo plantado cedo. Tal área, já no terceiro mês apresentava 95 % de infestação, como uma mortandade de cerca de 50% das plantas. Essa cultura, bem cuidada, chegou a ser um dos melhores algodoais de Campinas na safra de 1939-40. Por causa da praga a produção não chegou a 30 arrobas por alqueire.

Quando a área cultivada se extende de modo amplo em prazo regular, os adultos encontram maior campo de ação e os efeitos deixam de ser tão evidentes. O ataque seria semelhante, porém o número elevado de pés contribue não só para a dispersão da infestação, como faculta menor população de indivíduos, por planta, contribuindo desse modo para que esta resista com mais facilidade. Sem duvida é essa uma das causas de serem, aparentemente, os plantios tardíos os menos prejudicados.

Ainda a queda pluviométrica, sendo desigual no começo da estação, só mais tarde se uniformiza e satisfaz á vegetação fluente das plantas, o que de certo modo contribúe para que elas possam resistir melhor ao ataque da praga. Observações conduzidas nesse sentido mostraram que as áreas de algodoais, principalmente as de tamanhos menores, apresentavam uma mortalidade pronunciada, quando, por uma falta temporaria de chuvas, as plantas começavam a sentir os efeitos da sêca. E, contrariamente, algodoais bem infestados puderam resistir quando as condições foram, para as plantas, continuamente satisfatórias.

Também foi verificado que, apezar de plantadas tardiamente, porém não tanto como as das redondezas, certas culturas foram muito sacrificadas, embora tivessem sido usadas todas as medidas de combate preconizadas. Idênticas áreas, semeadas ao mesmo tempo que as demais, tiveram infestação equivalente. Contribue isso para provar que a maior densidade de plantas, constituindo um fator de dispersão da população de adultos, favorece a diminuição aparente do ataque.

No começo da cultura, enquanto as plantas são pequenas, os adultos que transpuzeram o inverno são atraídos para os novos algodoais. Inicialmente alimentam-se de qualquer porção das plantinhas,

não sem manifestar preferência pelas regiões mais inferiores das hastes. Em consequência desse ataque pode advir a perda de certo número de pés.

Conquanto não seja comum, a postura pode ocorrer em plantas muito tenras, porém estas, não suportando o ataque, morrem antes que a larva tenha concluido o seu desenvolvimento, o que em última análise acarretará também a morte do indivíduo.

A' medida que as plantas crescem, a predileção pela região do coléto se acentúa. Daí em diante a atividade da broca que transpôs o inverno torna-se normal, determinando não só a contaminação inicial, em razão da qual muitas plantas morrem, como proporcionando as novas gerações, as quais se vão embricando, graças à sua fecundidade e longevidade pronunciadas. Portanto, desde o começo da cultura, e enquanto persistirem as plantas no terreno, as brocas multiplicam-se contínua e intensamente, apezar do hábito muito difundido do arrancamento e destruição dos pés visivelmente atacados ou mortos durante a safra. O fim dessa medida seria prevenir as gerações formadas na cultura. Com essa prática, de fato se consegue diminuir certa população de futuros adultos, porém o número criado nas plantas que não evidenciam a infestação é muito mais elevado do que os porventura eliminados pelo uso desse processo. E, devido à criação continuada, no fim da colheita a quasi totalidade das plantas apresentam-se atacadas.

A região do coléto, um pouco abaixo ou acima da superfície do solo, é o lugar preferido quasi exclusivamente para a alimentação ou postura, depois que as plantas já lignificaram a haste. A alimentação pode ser verificada por pontuações existentes no caule, diferentes das perfurações feitas para construção da célula do ovo. Este, posto debaixo da superficie da cásca, em cerca de 9 dias nos meses de Outubro a Março, eclóe, saíndo a larva, que inicia a alimentação abrindo galerias irregulares. De acôrdo com a natureza do ataque, uma unica larva poderá determinar a morte da planta, mas, geralmente, para que tal aconteça, maior número de larvas são necessarias. Antes da transformação em ninfa, a larva constróe uma célula na região lenhosa e mais central, fazendo uma perfuração até a casca, para garantir a saída do adulto. Do nascimento até a imagem são necessarios cerca de 55 dias. Depois de nascido, o adulto não abandona a celula senão após 8 dias em média, e a deposição do primeiro ovo ocorre cerca de 5 dias depois. De ovo até ovo, portanto, nos meses de Outubro a Março, decorrem cerca de 77 dias aproximadamente. Das duas primeiras gerações, que são as que mais de perto interessam a este trabalho, a primeira se processa em tempo menor que a segunda. A capacidade de postura das fêmeas é bem elevada e durante o período de vida são

capazes de pôr em média 162 ovos, com uma média diaria de 3 ovos, havendo sido obtido um máximo de 360 ovos. A temperatura e umidade exercem ação pronunciada em todos os estádios de desenvolvimento e mesmo nas atividades, e enquanto as altas ocasionam aceleração, as baixas as reduzem, sem porém determinar uma paralização completa. Nas condições atualmente existentes ainda não foi observado qualquer estado de repouso completo (2).

## PONTOS CONSIDERADOS NO ESTUDO DE UM NOVO PROCESSO DE COMBATE

Em linhas gerais, os processos aconselhados, de profiláxia e combate à broca do algodoeiro, constam de: 1 — rotação de cultura; 2 — plantio tardio e uso de maior quantidade de sementes; 3 — eliminação, durante a cultura, das plantas visivelmente atacadas; 4 — aplicação de todos os tratos de terreno e culturais necessarios; 5 — arrancamento das soqueiras, queima e limpeza conveniente dos campos após a colheita.

Pela análise dessas diferentes medidas verifica-se que tais meios ou transtornam a vida do inséto no estado adulto, ou visam, principalmente, a destruição de suas formas imaturas, ou ainda, proporcionando condições mais adequadas às plantas, emprestam-lhes uma relativa faculdade de resistência ao ataque da praga. Nenhuma delas, de um modo geral, se preocupa com o combate diréto do adulto.

Indubitavelmente tais processos, visando criar condições menos favoráveis à vida da broca adulta, ou a eliminação das suas formas jovens com o fito de prevenir o aumento da população dos adultos e por conseguinte menor possibilidade de infestação e prejuizos, são valiosos e devem ser conservados.

Efetivamente as medidas mecânicas e culturais preconizadas conseguem diminuir parcialmente os efeitos da broca; mas já porque nem sempre tais medidas são bem aplicadas, já porque os adultos criados no decurso da cultura representam uma população elevada, que será relativamente pouco influenciada por elas, dada a capacidade de resistirem a condições muito adversas, e que prejudicará a nova cultura em vista da sua pronunciada longevidade, torna-se evidente que outros processos precisam ser considerados com o fim de servirem de complemento aos já existentes. Pelo arrancamento e queima das soqueiras ou plantas mortas durante a cultura diferentes estádios do inséto são eliminados. Mas as brocas que se criam em plantas que não mostram claramente os efeitos da praga, devido aos habitos do inséto nessas condições, não são passiveis de combate conveniente. O es-

tádio que oferece melhores perspectivas é o constituido pelos insétos adultos; por isso nossos estudos visaram um modo de combater o *G. brasiliensis* HAMBL. nesse estado, por meio químico.

Conseguido êsse objetivo seria possivel não só reduzir a infestação inicial e seguintes, como também diminuir a população dos adultos em detrimento de uma infestação intensa e continuada, e ainda a propria quantidade de indivíduos por planta, com evidentes resultados para o algodoeiro. E mesmo que a melhoria da produção não fosse imediata, consideramos que o combate aos adultos, constituindo mais um processo eficaz, contribuiria para reduzir ainda mais a possibilidade de grandes infestações em futuros plantios. Verificações posteriores, porém, mostraram a possibilidade do aumento imediato de produção nos ensaios, pelo menos em quantidade capaz de compensar folgadamente o tratamento, si bem que a esse respeito ainda faltem maiores informações.

Por analogia com outras espécies notou-se a viabilidade do combate por meio de pulverizações adequadas. Restava simplesmente esclarecer quais as informações sôbre a biologia da praga que deveriam ser aproveitadas. Atendendo a essas considerações e analisando os hábitos dos insétos adultos, verificou-se que:

1.º — as brocas que transpõem o inverno, logo que surgem as plantinhas da nova cultura, são atraídas para os algodoais e delas se alimentam antes de iniciarem a postura;

2.º — inicialmente alimentam-se de qualquer parte das plantas, porém, á medida que estas se desenvolvem, mostram notavel preferência pelos caules; e iniciada a oviposição, a alimentação processa-se quasi exclusivamente nessa parte;

3.º — a postura começa quando os algodoeiros atingem cerca de 8-10 cms. de altura;

4.º — durante a preoviposição, isto é, no prazo compreendido entre a emergência do adulto do caule até a deposição do primeiro ovo, período que dura em média, cerca de 5 dias, as brocas alimentam-se indiferentemente de folhas e cascas da planta, com notável preferência pela porção baixa dos caules;

5.º — em qualquer período de sua vida ativa, quando as plantas já estão desenvolvidas, os adultos se alimentam especialmente da porção baixa dos caules, e só excepcionalmente da casca da parte superior do tronco ou ramos, e das folhas;

6.º — o período necessario para o desenvolvimento completo, desde o ovo até a saída do adulto do caule do algodoeiro, é de 72 dias aproximadamente, durante os meses de Outubro a Março, meses em que as altas temperaturas e a umidade são mais pronunciadas, processando-se o ciclo da primeira geração em tempo menor que o da segunda.

## EXPERIÊNCIAS COM O FIM DE DETERMINAR O EFEITO DOS INSETICIDAS ARSENICAIS SÔBRE A BROCA

Foi PYENSON (5) quem, em trabalho publicado em 1938, primeiramente divulgou breve nota sôbre a ação provavel dos arsenicais sôbre a broca do algodoeiro, como complemento de suas observações sôbre a praga nas condições do Estado de Pernambuco. Afóra essa ligeira comunicação, nenhuma outra foi feita relativamente ao combate a essa praga por processo químico.

As observações conduzidas, quer no campo, quer no laboratório, mostraram clara e definitivamente que os inseticidas exercem ação capaz de ser favoravelmente aproveitada no combate à broca. E apezar das falhas involuntariamente praticadas, constantes em trabalhos dessa natureza e que com a prática adquirida vão sendo eliminadas, todos os dados obtidos confirmaram convincentemente tais resultados. Certos aspétos ainda não se resolveram, como por exemplo, quais as épocas mais adequadas às pulverisações. Mas, provada a viabilidade do combate por processo químico, o problema pode ser considerado resolvido em sua fase preliminar, restando às experiências futuras a confirmação de sua utilização prática e econômica.

### ALIMENTAÇÃO DOS ADULTOS E PERTURBAÇÕES PROVOCADAS PELO ENVENENAMENTO

E' certo que em plantas muito pequenas a alimentação pode ocorrer em qualquer região, havendo tendência para as porções inferiores das hastes. Assim que os algodoeiros oferecem condições para a postura, manifesta-se a predileção quasi exclusiva pelas regiões baixas dos caules e, daí por diante, a zona imediatamente próxima da superficie do solo é a constantemente procurada. Pequenas perfurações são feitas com o rostro, de tamanho aproximado do da cabeça de um alfinete, as quais às vezes se avolumam pouco mais sob a epiderme (Est. 90, fig. *B a*). Tais incisões da casca são diferentes das feitas para a construção da célula do ovo, que são de forma aproximadamente semicircular. No entanto quer na primeira, quer na segunda, as porções retiradas são ingeridas. Partes lisas dos caules, que constitúem as partes superiores, são muito raramente procuradas para qualquer fim, mesmo quando as da região do colêto não oferecem melhores condições. Nelas a alimentação processa-se diferentemente (Est. 90, fig. *Bb*): ao em vez de perfurarem, raspam a casca. Só muito mais tarde, no fim da cultura, é que tais porções são mais atingidas, principalmente quando a outra foi muito prejudicada pelo ataque no decurso da cultura.

Evidentemente todas as vêzes que se colocaram brocas com caules pulverizados estas apresentavam sintomas muito típicos de envenenamento, quasi sempre perecendo; só raramente resistiam à ação do inseticida, o que acontecia quando não se alimentavam, ou coincidiam em perfurar áreas não envenenadas ou prosseguir a alimentação numa perfuração feita por outra, anteriormente.

Em plantas do campo, sujeitas a contrôle, o mesmo fato se observara. Quer alimentando-se, quer abrindo a célula do ovo, as brocas, ingerindo as porções retiradas, sofrem, em geral, muito rapidamente as consequências produzidas pelo inseticida. Êste, nas regiões inferiores, é muito bem espalhado, aderente e protegido, em vista das rugosidades e fendilhamentos naturais e proteção que a folhagem proporciona contra as intemperies. Aparentemente é dificil crer que uma tão insignificante área envenenada seja tão eficaz. Casos houve em que cerca de 40 minutos depois de alimentadas, as brocas estavam inteiramente inertes e praticamente mortas. Êsse prazo é, normalmente, de maior duração e relaciona-se com a quantidade do inseticida ingerido. A primeira manifestação do envenenamento consiste na perda da agilidade, tão caracteristica nas brocas sadías. Seus movimentos são retardados. Quando quietas, apoiam a cabeça na superficie sôbre a qual repousam; as patas anteriores ficam um pouco encolhidas, enquanto as posteriores se distendem, de modo que a porção abdominal se levanta de tal forma que o corpo toma uma posição obliqua, típica e inconfundivel. Os musculos se relaxam e os movimentos tornam-se cada vez mais lentos; não se podem mais suster sôbre as patas, permanecendo deitadas de lado ou de dorso, muitas vêzes com as patas distendidas, incapazes de, como as sadías, guardarem a posição de defeza. Reagem lentamente quando tocadas e só pela ação do calor, num supremo esforço, ainda se movimentam. O excremento torna-se inicialmente pastoso e depois, já nas últimas manifestações de vida, nota-se na porção anal uma massa esbranquiçada, aderente. Mesmo nas que mostram poucas perturbações já a atividade, já a longevidade são muito reduzidas. Em laboratório, algumas conseguiram resistir e voltar à normalidade. Normalmente, porém, as que ficaram por 10 dias em contacto com partes envenenadas não resistiram. Em todo caso, si conseguem resistir, em 20 dias voltam à normalidade. Mas isso foi raro. No campo, brocas mantidas em contacto com caules pulverizados normalmente, mostraram uma mortalidade de 91,1% no fim do quinto dia e 98,7% no décimo dia.

Para a obtenção dos dados das tabelas 2 e 3, cujo fim foi determinar a relação entre a alimentação e o envenenamento dos adultos, empregaram-se partes inferiores de caules pulverizados, em condições

usuais, porções essas parafinadas nas duas extremidades, e confinadas em caixas de petri, cada uma com um indivíduo. Os arseniatos de calcio e chumbo foram empregados na concentração de 600 grs. para 100 litros de agua. Porções de caules não tratados e submetidos às usuais condições serviram para alimentar as brocas testemunhas, constantes da tabela 4. Diariamente foram examinados, anotadas as perfurações feitas para alimentação; e, para evitar que as brocas voltassem a se alimentar no mesmo local, obstruiam-se as picadas nos caules.

Confrontando-se os números expressos nas tabelas, ressalta primeiramente a influência exercida pelos inseticidas empregados, em comparação com as testemunhas.

Nas tabelas 2 e 3 praticamente o mesmo prazo foi requerido para que todas as brocas morressem. Nos tratados com o arseniato de chumbo, porém, os indivíduos se alimentaram por mais tempo, e as perfurações, em grande número de casos, sustaram-se pouco antes das brocas morrerem. Normalmente o total de perfurações por indivíduo foi superior ás dos caules tratados com arseniato de calcio. Este inseticida mostrou-se incomparavelmente mais ativo: menor número de picadas foram requeridas e as atividades da praga foram mais prontamente paralizadas.

Considerando-se a média total de picadas feitas, já diariamente, já englobadamente, durante os 14 dias, verifica-se que no arseniato de calcio tal número foi mais limitado. O número médio de perfurações nesse período foi de 7,32 para fêmeas e 5,29 para os machos em contacto com o arseniato de calcio, tendo-se elevado, no de chumbo, a 17,5 e 14,9 para fêmeas e machos, respectivamente.

Aparentemente as fêmeas morrem um pouco mais rapidamente que os machos. Talvez o fato de ingerirem tambem a parte da porção retirada na construção da célula do ovo seja a razão. Tal como se pode presenciar, certos indivíduos não se alimentaram em certos dias. Nem sempre a primeira alimentação determina a morte. Mas pode-se observar que depois de envenenadas a ação se restringe muito porque em pouco tempo a broca sente as perturbações nocivas.

O fato de certas brocas não se alimentarem nos primeiros dias deu-nos a impressão de uma provável repelência pelos caules tratados. Em verificação dessa hípotese, os caules foram parcialmente pulverizados, dando lugar à preferência da broca. Em outros casos juntaram-se aos caules não tratados, outros envenenados. Pôde-se verificar que nem em caules do campo, nem nos tratados do modo exposto, houve a mínima manifestação de repelência, morrendo os indivíduos em condições idênticas aos demais considerados na tabela, inclusive no mesmo prazo.

TABELA 2

Alimentação dos adultos de *G. brasiliensis* HAMB. em caules pulverizados com arseniato de cálcio mostrando para os machos e fêmeas o número de perfurações feitas diariamente e a ação do inseticida

| Individuo | Machos — N.o de perfurações por dia | | | | | | | | | | | | | | Total | Fêmeas — N.o de perfurações por dia | | | | | | | | | | | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | —* | | | | | | | 5 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 16 |
| 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | — | | | 7 | 2 | 2 | — | | | | | | | | | | | | 4 |
| 3 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | | 3 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | — | | | | | | | | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | 4 |
| 5 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 8 | 11 | 17 | 11 | 2 | 2 | 0 | 0 | — | 60 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 6 | 3 | 1 | — | | | | | | | | | | | | 4 | 1 | 2 | 1 | 1 | 5 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | | | | | 14 |
| 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 2 | 2 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 2 |
| 8 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | 5 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 9 | 3 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | | | | 3 | 1 | – | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 10 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | 13 |
| 11 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | 6 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | 11 |
| 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | | 2 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | 4 |
| 13 | 2 | 1 | 1 | — | | | | | | | | | | | 4 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | - | | | | | | | | 7 |
| 14 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | — | | | | | | 4 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | 5 |
| 15 | 1 | 4 | 3 | 1 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | — | | | | | 16 | 2 | 1 | 2 | — | | | | | | | | | | | 5 |
| 16 | 5 | — | | | | | | | | | | | | | 5 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 17 | 4 | — | | | | | | | | | | | | | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | – | | | | | | 3 |
| 18 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | | 1 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 1 |
| 19 | 3 | — | | | | | | | | | | | | | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | — | | | | | | 12 |
| 20 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 3 | 1 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | 6 |
| 21 | 3 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | — | | | | | 7 |
| 22 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 9 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 23 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 5 |
| 24 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | — | | | | | | | | | | 3 |
| 25 | 3 | | | | | | | | | | | | | | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | | | | | | | | | 4 |
| 26 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 27 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 1 | 0 | 4 | 4 | 3 | 4 | 9 | 10 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 34 |
| 28 | 7 | — | | | | | | | | | | | | | 7 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 | 14 | 10 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 34 |
| 29 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 30 | 0 | 1 | 2 | .5 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | — | | | | | 13 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 31 | 4 | — | | | | | | | | | | | | | 4 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 32 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | | | | | | | | 3 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 33 | 7 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | — | | | | | 14 | 1 | 4 | 5 | 7 | 13 | 15 | 9 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 59 |
| 34 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 6 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | | 4 |
| 35 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | — | | | | | | 3 |
| 36 | 3 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 37 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 4 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | 14 |
| 38 | 3 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | 9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 1 | 3 | 0 | — | | | | | 10 |
| 39 | 1 | 0 | 2 | 0 | — | | | | | | | | | | 3 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 40 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | 1 |
| 41 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | | 13 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 2 | — | | | | | | | | 7 |
| 42 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | 5 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | 8 |
| 43 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | 2 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 44 | 1 | — | | | | | | | | | | — | | | 1 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 45 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | | | | | 1 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 46 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 8 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 5 |
| 47 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | 2 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 48 | 2 | 1 | — | | | | | | | | | | | | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 4 | 0 | 8 | 9 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | 30 |
| 49 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 50 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 51 | 2 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2,2 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,4 | 0,9 | 1,2 | 1,05 | 0,9 | 0,2 | 0,4 | 0 | 0 | | 5,29 | 1,2 | 1,7 | 1,3 | 0,7 | 1,7 | 1,8 | 2,4 | 1,2 | 0,8 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | | 7,32 |

* — = morte do individuo.

TABELA 3

Alimentação dos adultos de *G. brasiliensis* HAMB. em caules pulverizados com arseniato de chumbo mostrando, para os machos e fêmeas, o número de perfurações feitas diariamente e a ação do inseticida

| Individuo | Machos | | | | | | | | | | | | | | Total | Fêmeas | | | | | | | | | | | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N.º de perfurações por dia | | | | | | | | | | | | | | | N.º de perfurações por dia | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| 1 | 10 | 2 | 3 | 5 | 12 | 6 | 3 | 1 | 1 | —* | | | | | 43 | 1 | 3 | — | | | | | | | | | | | | 4 |
| 2 | 3 | 4 | 2 | 5 | 11 | 4 | 2 | 0 | — | | | | | | 31 | 3 | 7 | 1 | 5 | 0 | 2 | 5 | 0 | 2 | 1 | 6 | 2 | — | | 34 |
| 3 | 3 | 2 | 8 | 9 | 17 | 4 | 8 | 2 | 1 | 1 | 1 | — | | | 56 | 1 | 2 | 0 | 4 | 0 | 2 | 1 | 0 | — | | | | | | 10 |
| 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 4 | 3 | 3 | — | | | | | | | 13 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 1 |
| 5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 5 | 6 | 1 | 0 | 0 | — | | | | | 23 | 1 | 2 | 3 | 6 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | 16 |
| 6 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 4 | 3 | — | | | | | | | 12 | 8 | 2 | 8 | 19 | 17 | 6 | 3 | 5 | 1 | 0 | 4 | 1 | 0 | — | 74 |
| 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | — | | | | | | | 6 | 5 | 0 | 3 | 6 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | — | 23 |
| 8 | 1 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | 2 | 3 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 3 |
| 9 | 2 | 1 | — | | | | | | | | | | | | 3 | 3 | 1 | 0 | 10 | 2 | 2 | — | | | | | | | | 18 |
| 10 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 | 4 | 1 | 0 | 8 | 0 | 2 | 0 | — | | | | | | | 15 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 1 | 0 | — | | | | | | | 9 | 1 | 2 | 1 | 18 | 7 | 6 | 1 | — | | | | | | | 36 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | — | | | | | | | | 6 | 0 | 1 | 0 | 14 | 6 | 8 | 1 | 3 | 1 | 1 | — | | | | 35 |
| 13 | 1 | 0 | — | | | | | | | | | | | | 1 | 5 | 3 | 0 | 3 | 4 | 0 | — | | | | | | | | 15 |
| 14 | 2 | — | | | | | | | | | | | | | 2 | 1 | 0 | 0 | 6 | 8 | 1 | 5 | 0 | 1 | 0 | — | | | | 22 |
| 15 | 1 | 4 | 2 | 0 | 2 | 2 | 4 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | — | | 25 | 4 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | — | | | | | | | 11 |
| 16 | 1 | 0 | 0 | 2 | 3 | 2 | — | | | | | | | | 8 | 1 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 2 | — | | | | | | | 8 |
| 17 | 4 | 0 | 3 | 1 | 9 | 0 | 2 | 1 | 0 | — | | | | | 20 | 2 | 2 | 2 | — | | | | | | | | | | | 6 |
| 18 | 3 | 5 | 4 | 6 | — | | | | | | | | | | 18 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | — | | | | | | | 7 |
| 19 | 2 | 4 | 2 | 4 | 14 | 7 | 5 | 4 | 2 | — | | | | | 44 | 2 | 11 | — | | | | | | | | | | | | 13 |
| 20 | 3 | 1 | — | | | | | | | | | | | | 4 | 2 | 2 | — | | | | | | | | | | | | 4 |
| 21 | 3 | — | | | | | | | | | | | | | 3 | 3 | — | | | | | | | | | | | | | 3 |
| 22 | 3 | 0 | 2 | 0 | 7 | 6 | 5 | 0 | 2 | | | | | | 25 | 1 | — | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 23 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | — | | | | | | | | 6 | 6 | 0 | 0 | 11 | 4 | 3 | 1 | — | | | | | | | 25 |
| 24 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | — | | | | | | | | | 4 | 5 | 1 | 0 | 6 | 6 | 3 | 0 | — | | | | | | | 21 |
| 25 | 1 | 0 | 0 | 4 | 2 | 1 | — | | | | | | | | 8 | 4 | 2 | 1 | 9 | 6 | 7 | 4 | 0 | 0 | — | | | | | 33 |
| | 2 | 1,5 | 1,5 | 2,6 | 5,9 | 3,1 | 3 | 1,1 | 1,1 | 2 | 1,5 | 2 | | | 14,9 | 2,7 | 1,9 | 1,05 | 7,8 | 4 | 2,8 | 1,6 | 1,2 | 0,7 | 0,3 | 2,7 | 1 | 0 | | 17,5 |

* — = morte do individuo.

TABELA 4

Alimentação dos adultos de *G. brasiliensis* HAMBL. em caules não tratados, mostrando o número de perfurações feitas diariamente

| Individuo | Machos — N.º de perfurações por dia | | | | | | | | | | | | | | Total | Fêmeas — N.º de perfurações por dia | | | | | | | | | | | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| 1 | 3 | 11 | 1 | 3 | 3 | 9 | 7 | 1 | 2 | —* | | | | | 40 | 2 | 2 | 6 | 6 | 4 | 15 | 8 | 13 | 9 | 0 | 5 | 5 | 2 | 9 | 86 |
| 2 | 6 | 5 | — | | | | | | | | | | | | 11 | 14 | 5 | 3 | 9 | 3 | 7 | 7 | 4 | 8 | 5 | 5 | 1 | 5 | 5 | 81 |
| 3 | 13 | 8 | 5 | 0 | 13 | 6 | 3 | 2 | 8 | 0 | 4 | 1 | 5 | 6 | 74 | 5 | 3 | 7 | 8 | 12 | 8 | 6 | 6 | 3 | 1 | 1 | 5 | 2 | 2 | 69 |
| 4 | 12 | 6 | 2 | 8 | 5 | 9 | 6 | 6 | 6 | 5 | 10 | 3 | 10 | 5 | 93 | 6 | 9 | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 | 5 | 6 | 0 | 5 | 7 | 2 | 5 | 51 |
| 5 | 12 | 12 | 5 | 7 | 8 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 2 | 0 | 5 | 2 | 68 | 9 | 3 | 4 | 12 | 12 | 16 | 2 | 12 | 13 | 5 | 9 | 6 | 5 | 7 | 115 |
| 6 | 13 | 10 | 8 | 5 | 9 | 3 | 9 | 10 | 8 | 2 | 1 | 5 | 10 | 2 | 95 | 9 | 4 | 2 | 5 | 12 | 18 | 15 | 12 | 7 | 9 | 5 | 6 | 3 | 2 | 109 |
| 7 | 1 | 0 | 0 | 24 | 3 | 0 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 0 | 0 | 5 | 43 | 1 | 1 | 3 | 10 | 5 | 3 | 9 | 1 | 6 | 4 | 2 | 1 | 1 | 5 | 52 |
| 8 | 3 | 2 | 0 | 15 | 0 | 13 | 8 | 8 | 3 | 4 | 0 | 7 | 0 | 7 | 70 | 7 | 0 | 1 | 0 | 5 | 10 | 1 | 11 | 0 | 4 | 1 | 0 | 1 | 4 | 45 |
| 9 | 2 | 3 | 8 | 9 | 2 | 5 | 5 | 3 | 2 | 3 | 9 | 3 | 1 | 1 | 56 | 6 | 9 | 0 | 8 | 3 | 1 | 4 | 1 | 2 | 0 | 4 | 3 | 4 | 2 | 47 |
| 10 | 4 | 1 | 1 | 2 | 0 | 7 | 2 | 3 | 1 | 0 | 2 | 2 | — | | 25 | 5 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 11 | 1 | 6 | 4 | 0 | 6 | 8 | 51 |
| 11 | 3 | 0 | 0 | 5 | 7 | 11 | 3 | — | | | | | | | 29 | 6 | 3 | 8 | 6 | 14 | 7 | 8 | 15 | 1 | 2 | 2 | 3 | 0 | 9 | 84 |
| 12 | 3 | 5 | 7 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 2 | 1 | 5 | 6 | 5 | 4 | 58 | 3 | 5 | 9 | 7 | 14 | 20 | 18 | 17 | 10 | 16 | 3 | 2 | 1 | 5 | 130 |
| 13 | | | | | | | | | | | | | | | | 2 | 6 | 8 | 6 | 21 | 25 | 15 | 2 | 14 | 5 | 18 | 6 | 20 | 8 | 156 |
| | 6,2 | 5,2 | 3,3 | 8 | 4,6 | 6,1 | 4,6 | 4,2 | 3,7 | 2,2 | 3,8 | 3 | 4,5 | 4 | 55,1 | 5,7 | 3,8 | 4,1 | 6,1 | 8,3 | 10,2 | 7,3 | 8,4 | 6,1 | 4,3 | 4,9 | 3,4 | 4 | 5,4 | 82,7 |

* — = morte do individuo.

TABELA 5

Resumo da atividade ovipositora das fêmeas antes e depois de colocadas com caules pulverizados com 250 grs. de ars. de calcio para 100 ls. de agua

Campinas, 1940

| N.o do indivíduo | Caules não pulverizados | | | | | Caules pulverizados | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Abril | Maio | | | | | | | Junho | | |
| | 22 a 26 | 27 a 1 | 2 a 6 | 7 a 11 | 12 a 16 | 17 a 21 | 22 a 26 | 27 a 31 | 1 a 5 | 6 a 10 | 11 a 15 |
| 1 | 2 | 4 | 2 | 5 | 5 | —* | | | | | |
| 2 | 4 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | | | |
| 3 | 0 | 3 | 7 | 5 | 6 | 0 | — | | | | |
| 4 | 1 | 6 | 2 | 3 | 4 | 0 | — | | | | |
| 6 | 0 | 4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| 8 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | — | | | |
| 10 | 3 | 7 | 6 | 1 | 8 | 0 | — | | | | |
| 12 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | | | |
| 15 | 1 | 6 | 4 | 0 | 2 | 2 | 0 | — | | | |
| 16 | 0 | 2 | 4 | 2 | 4 | — | | | | | |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 | — | | | | |
| 21 | 1 | 5 | 4 | 6 | 4 | 0 | 0 | — | | | |
| 22 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 2 | 0 | — | | | |
| 23 | 3 | 5 | 6 | 1 | 5 | — | | | | | |
| 24 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| 26 | 0 | 1 | 4 | 0 | 1 | 3 | 0 | — | | | |
| 27 | 2 | 2 | 0 | 3 | 6 | — | | | | | |
| 29 | 0 | 0 | 1 | 3 | 2 | — | | | | | |
| 30 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 3 | — | | | | |
| 31 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | — | | | | | |
| 32 | 0 | 0 | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | — | | | |
| 34 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | | |
| 46 | 0 | 0 | 4 | 3 | 5 | — | | | | | |
| 48 | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | — | | | | | |
| 49 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 | — | | | | | |
| 64 | 2 | 0 | 5 | 2 | 4 | 2 | — | | | | |
| 65 | 0 | 2 | 4 | 3 | 8 | 5 | 0 | — | | | |
| 77 | 1 | 0 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | — | | |
| 78 | 4 | 0 | 2 | 0 | 2 | 5 | 0 | 0 | 0 | — | |
| 94 | 0 | 4 | 4 | 5 | 5 | 0 | 1 | — | | | |
| 95 | 0 | 4 | 5 | 2 | 0 | — | | | | | |

* — = morte da fêmea.

Tanto os machos como as fêmeas morrem, pelo envenenamento, nas mesmas proporções que as de sexos. De 3.975 indivíduos examinados durante os trabalhos 2.073, ou sejam 52%, eram fêmeas e 1.902, ou 47%, machos.

Verificando-se que em muitos casos a longevidade da broca se reduz, embora certos indivíduos sejam capazes de resistir e manter aparentemente uma atividade normal depois de terem ingerido o inseticida e apresentado nitidos sintomas de envenenamento, resolveu-se verificar a relação possível entre a ação do veneno e a capacidade ovipositora da fêmea. Certo número de especimens foram colocados com machos, para ser garantida a fecundidade e, depois de se verificar que a postura ocorria normalmente num conjunto de fêmeas, isolou-se individualmente cada uma em uma caixa de petri, fornecendo-se-lhe diariamente porções de caules convenientes. De 22 de Abril a 26 de Maio foi anotada diariamente a postura. Na tabela 5 incluiram-se sòmente as fêmeas consideradas sob regimen regular de postura. Subitamente, do dia 16 para 17 de Junho as porções de caules foram substituidas por outras, tratadas, com as pontas parafinadas. Nesse tratamento, justamente para obter uma ação mais lenta, empregaram-se sòmente 250 grs. do arseniato de calcio para 100 litros de agua. Após os primeiros 5 dias, cerca de 32% das fêmeas tinham morrido e sòmente 25,8% ainda ovipuzeram 25 ovos. Depois do décimo dia 51,6% haviam morrido, mas das restantes sòmente 6,4% depositaram ovos, e em número de dois apenas. Nos dias imediatos a postura cessou completamente, apezar de haver fêmeas cuja vida ainda perdurou por mais 16 dias, seja um total de 24 dias a contar da data da substituição dos caules. Em consequência das perturbações causadas pelo arseniato de calcio, houve pronta redução de postura já a partir do dia imediato à substituição dos caules, e mesmo as fêmeas sem manifestação aparente de intoxicação suspenderam essa atividade enquanto permaneceram com vida.

## ENSAIOS PARA VERIFICAR TANTO O EFEITO DO INSETICIDA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, COMO A COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS ARSENICAIS

Durante as observações conduzidas com esse fim, teve-se oportunidade de verificar em laboratório o comportamento da praga perante os três produtos, arseniato de calcio, a. de chumbo e a. de aluminio, constantes da tabela 6. Doze indivíduos em cada caixa de petri foram mantidos em contato com porções inferiores de caules pulverizados, desde um até vinte dias consecutivos, de tal modo que a alimentação se processasse um só dia, ou dois, ou três, etc., em caules tra-

tados; estes eram substituidos, para que nos dias restantes, até o vigésimo, os insetos se alimentassem de caules normais. Desse modo os indivíduos se alimentaram de partes envenenadas, uns sòmente um dia, outros, dois, outros, três, etc., até um período continuado de vinte dias. Vinte caixas de petri foram utilizadas para cada observação das diferentes concentrações e arseniatos empregados. Os caules pulverizados eram cortados em porções de 10 cms. de tamanho, parafinados nas extremidades, preparando-se de uma só vez toda a quantidade necessaria aos trabalhos, a qual se conservava em caixas de vidro pelo prazo conveniente. Cada três dias todos os pedaços de caules das caixas eram trocados por outros novos, continuando porém idênticas as condições. Isso foi necessário não só para evitar que os pedaços se ressecassem, mas principalmente para obstar a que as brocas se servissem das perfurações já feitas por outras, fato que é muito comum. Os dados foram colhidos diariamente e, para efeito da tabela, reunidos cada 5 dias. Cada experiência foi acompanhada de lotes testemunhas, providos sempre, em igualdade de condições, com os caules não tratados.

Como sempre aconteceu, o arseniato de calcio (40,18% $As^2$ $O^5$ comb. 43,93% CaO) constituiu o inseticida de melhor efeito, seguido pelo chumbo (32,2% $As^2$ $O^5$ comb. 55,3% PbO), ficando os resultados obtidos com o arseniato de aluminio (27,60% $As^2$ $O^5$ total, 1,38% $As^2$ $O^5$ sol.), muito aquem dos conseguidos com os dois precedentes.

A concentração de 500 gramas do arseniato de calcio para 100 litros de agua foi muito satisfatória, não havendo, praticamente, depois de seis dias, diferença entre esta e dosagens mais elevadas, considerada a porcentagem de mortandade verificada depois do décimo dia. Nos dados da tabela estão computados os indivíduos que morreram efetivamente no fim dos dias considerados. Os que, embora muito doentes, ainda podiam realizar certos movimentos, não foram considerados. Essa a razão principal da discrepância das porcentagens notadas nos primeiros dias, já porque o inseto não se alimentou, já porque a dose ingerida não foi suficientemente forte para exercer uma ação letal mais rapida.

Desde que, no laboratório, a concentração de 0,50% de arseniato de calcio se mostrou bem eficiente, resolveu-se, com êsse mesmo produto, confirmar os resultados no campo, em condições controladas. Como mostra a estampa 91, fig. *C*, os caules foram pulverizados normalmente, com os algodoeiros ainda intátos, tendo-se unicamente limpado o terreno das folhas e matos. Em seguida, para que pudessem ser abrigadas com manilhas (Est. 91, fig. *D*), apararam-se os ponteiros, parafinando-se a superficie cortada. As brotações e folhas baixas foram

TABELA 6

Porcentagem de mortandade de adultos da broca do algodoeiro proveniente do envenenamento ocasionado pela pulverização de caules de algodoeiros com inseticidas arsenicais

| Concentração | Arseniatos empregados | Exames depois de: | Número de dias em que os insetos foram alimentados com caules pulverizados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 0,40% | Calcio | 5 dias | 25,0 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 16,6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 16,6 | 41,6 | 16,6 | 41,6 | 33,3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 8,3 | 0 | 8,3 | 0 | 8,3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 10 dias | 33,3 | 8,3 | 25,0 | 41,6 | 75,0 | 58,3 | 33,3 | 41,6 | 83,3 | 83,3 | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 16,6 | 41,6 | 16,6 | 50,0 | 50,0 | 75,0 | 50,0 | 58,3 | 33,3 | 66,6 | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 8,3 | 0 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 0 | 16,6 | 0 | 16,6 | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 15 dias | 33,3 | 16,6 | 50,0 | 58,3 | 83,3 | 75,0 | 75,0 | 75,0 | 100 | 100 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Chumbo | | 16,6 | 41,6 | 25,0 | 50,0 | 66,6 | 75,0 | 66,6 | 58,3 | 41,6 | 100 | 83,3 | 91,6 | 75,0 | 75,0 | 83,3 | | | | | |
| | Alumínio | | 8,3 | 0 | 16,6 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 25,0 | 0 | 25,0 | 8,3 | 16,6 | 33,3 | 25,0 | 25,0 | | | | | |
| | Calcio | 20 dias | 41,6 | 25,0 | 50,0 | 66,6 | 83,3 | 83,3 | 75,0 | 91,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Chumbo | | 41,6 | 41,6 | 33,3 | 50,0 | 66,6 | 75,0 | 66,6 | 58,3 | 50,0 | 100 | 83,3 | 100 | 75,0 | 91,6 | 100 | 100 | 75,0 | 100 | 91,6 | 100 |
| | Alumínio | | 8,3 | 0 | 25,0 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 25,0 | 0 | 41,6 | 16,6 | 25,0 | 33,3 | 41,6 | 41,6 | 58,3 | 41,6 | 33,3 | 8,3 | 75,0 |
| 0,50% | Calcio | 5 dias | 25,0 | 66,6 | 16,6 | 25,0 | 25,0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 16,6 | 33,3 | 58,3 | 41,6 | 41,6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 0 | 16,6 | 0 | 0 | 8,3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 10 dias | 50,0 | 75,0 | 41,6 | 58,3 | 58,3 | 100 | 75,0 | 91,6 | 50,0 | 100 | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 16,6 | 41,6 | 66,6 | 41,6 | 91,6 | 41,6 | 66,6 | 50,0 | 58,3 | 83,3 | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 0 | 25,0 | 0 | 0 | 8,3 | 8,3 | 8,3 | 0 | 8,3 | 8,3 | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 15 dias | 66,6 | 75,0 | 41,6 | 66,6 | 75,0 | 100 | 100 | 100 | 75,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Chumbo | | 33,3 | 41,6 | 66,6 | 41,6 | 91,6 | 50,0 | 66,6 | 58,3 | 75,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 91,6 | | | | | |
| | Alumínio | | 8,3 | 25,0 | 8,3 | 16,6 | 8,3 | 8,3 | 33,3 | 0 | 25,0 | 8,3 | 0 | 16,6 | 8,3 | 50,0 | 41,6 | | | | | |
| | Calcio | 20 dias | 66,6 | 75,0 | 50,0 | 66,6 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Chumbo | | 50,0 | 58,3 | 66,6 | 41,6 | 91,6 | 58,3 | 75,0 | 66,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Alumínio | | 25,0 | 25,0 | 8,3 | 16,6 | 8,3 | 8,3 | 33,3 | 0 | 25,0 | 8,3 | 0 | 16,6 | 16,6 | 83,3 | 50,0 | 41,6 | 16,6 | 41,6 | 16,6 | 8,3 |

| Concentração | Arseniatos empregados | Exames depois de: | Número de dias em que os insetos foram alimentados com caules pulverizados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 0,60% | Calcio | 5 dias | 41,6 | 58,3 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 33,3 | 25,0 | 16,6 | 66,6 | 50,0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 25,0 | 0 | 25,0 | 25,0 | 16,6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 10 dias | 50,0 | 75,0 | 50,0 | 41,6 | 66,6 | 66,6 | 75,0 | 91,6 | 100 | 91,6 | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 33,3 | 25,0 | 25,0 | 75,0 | 75,0 | 100 | 66,6 | 91,6 | 91,6 | 91,6 | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 25,0 | 0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 8,3 | 0 | 33,3 | 25,0 | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 15 dias | 50,0 | 75,0 | 50,0 | 41,6 | 66,6 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Chumbo | | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 83,3 | 75,0 | 100 | 91,6 | 91,6 | 91,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Alumínio | | 25,0 | 0 | 25,0 | 50,0 | 33,3 | 25,0 | 8,3 | 0 | 58,3 | 16,6 | 25,0 | 41,6 | 33,3 | 50,0 | 66,6 | | | | | |
| | Calcio | 20 dias | 58,3 | 83,3 | 58,3 | 50,0 | 83,3 | 91,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Chumbo | | 58,3 | 50,0 | 33,3 | 83,3 | 75,0 | 100 | 91,6 | 100 | 91,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Alumínio | | 41,6 | 0 | 33,3 | 50,0 | 33,3 | 33,3 | 8,3 | 8,3 | 58,3 | 25,0 | 75,0 | 41,6 | 50,0 | 91,6 | 83,3 | 58,3 | 83,3 | 75,0 | 91,6 | 91,6 |
| 0,70% | Calcio | 5 dias | 41,6 | 41,6 | 25,0 | 58,3 | 41,6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 41,6 | 41,6 | 8,3 | 41,6 | 41,6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 8,3 | 8,3 | 16,6 | 0 | 16,6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 10 dias | 75,0 | 58,3 | 41,6 | 83,3 | 66,6 | 100 | 58,3 | 100 | 100 | 91,6 | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 41,6 | 58,3 | 33,3 | 66,6 | 50,0 | 66,6 | 100 | 91,6 | 83,3 | 83,3 | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 8,3 | 8,3 | 16,6 | 0 | 16,6 | 8,3 | 33,3 | 16,6 | 16,6 | 16,6 | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 15 dias | 83,3 | 58,3 | 50,0 | 91,6 | 75,0 | 100 | 66,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Chumbo | | 41,6 | 58,3 | 33,3 | 66,6 | 58,3 | 75,0 | 100 | 91,6 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Alumínio | | 16,6 | 16,6 | 33,3 | 8,3 | 41,6 | 33,3 | 33,3 | 25,0 | 25,0 | 41,6 | 41,6 | 41,6 | 50,0 | 66,6 | 58,3 | | | | | |
| | Calcio | 20 dias | 83,3 | 58,3 | 50,0 | 91,6 | 75,0 | 100 | 66,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Chumbo | | 41,6 | 58,3 | 58,3 | 83,3 | 58,3 | 100 | 100 | 91,6 | 91,6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Alumínio | | 16,6 | 33,3 | 41,6 | 8,3 | 41,6 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 25,0 | 58,3 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 75,0 | 100 | 66,6 | 41,6 | 16,6 | 75,0 | 75,0 |
| 0,80% | Calcio | 5 dias | 16,6 | 25,0 | 25,0 | 50,0 | 33,3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 8,3 | 41,6 | 83,3 | 50,0 | 58,3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 0 | 0 | 8,3 | 0 | 8,3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 10 dias | 16,6 | 25,0 | 66,6 | 75,0 | 75,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | | | | | | |
| | Chumbo | | 8,3 | 58,3 | 83,3 | 50,0 | 91,6 | 66,6 | 75,0 | 66,6 | 100 | 91,6 | | | | | | | | | | |
| | Alumínio | | 0 | 0 | 8,3 | 16,6 | 8,3 | 25,0 | 41,6 | 0 | 16,6 | 8,3 | | | | | | | | | | |
| | Calcio | 15 dias | 33,3 | 41,6 | 66,6 | 83,3 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Chumbo | | 25,0 | 66,6 | 91,6 | 66,6 | 91,6 | 75,0 | 83,3 | 66,6 | 100 | 100 | 100 | 75,0 | 100 | 100 | 100 | | | | | |
| | Alumínio | | 16,6 | 33,3 | 8,3 | 50,0 | 41,6 | 25,0 | 41,6 | 25,0 | 33,3 | 75,0 | 91,6 | 58,3 | 66,6 | 91,6 | 83,3 | | | | | |
| | Calcio | 20 dias | 33,3 | 41,6 | 66,6 | 83,3 | 83,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Chumbo | | 50,0 | 66,6 | 91,6 | 66,6 | 91,6 | 83,3 | 83,3 | 75,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Alumínio | | 16,6 | 50,0 | 8,3 | 58,3 | 75,0 | 25,0 | 66,6 | 33,3 | 58,3 | 83,3 | 91,6 | 83,3 | 83,3 | 100 | 100 | 83,3 | 100 | 91,6 | 91,6 | 91,6 |
| | Testemunha | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8,3 | 0 | 8,3 | 0 | 8,3 | 0 | 8,3 | 0 | 0 | 0 | 16,6 | 25,0 | 25,0 | 8,3 |

preservadas e constituiram a região não atingida pelo veneno. Cada manilha cobria entre duas a quatro plantas. Um total de 79 indivíduos foi empregado no conjunto de 25 manilhas. Ao fim do quinto dia 91,1% das brocas tinham morrido, e depois do décimo, sòmente uma estava viva, tendo sido de 98,7% a porcentagem de mortandade verificada. Apesar das condições confinadas as brocas tiveram campo para se utilizarem de diferentes porções dos caules, mas ainda aquí se evidenciaram a preferência pelas porções baixas e o efeito exercido pelo veneno nessa concentração. Em semelhantes condições tal operação foi duplicada mais uma vez no campo, com idênticos resultados, pois no fim do quinto e do décimo dia haviam morrido 92,4% e 97,4% respectivamente.

## EXPERIÊNCIAS REALIZADAS EM CONDIÇÕES NATURAIS — RESULTADOS PRELIMINARES

Efetivamente as experimentações foram iniciadas em condições naturais. Depois das indicações fornecidas pelos ensaios preliminares os trabalhos foram ampliados concomitantemente, quer no campo, quer no laboratório. De um modo geral, as observações tiveram por escopo determinar o efeito das pulverizações com caldas arsenicais sôbre a praga, assim como a conveniência, técnica e número provavel de aplicações necessarias, sem olvidar a parte econômica do problema. .

Com relação ao efeito dos inseticidas sôbre a praga, consideram-se muito satisfatórios os resultados obtidos. Como consequência prevê-se no futuro o emprego das pulverizações como mais um processo de combate. A técnica de aplicação, muito simples, deve sòmente condizer com os hábitos de alimentação e postura do inseto. Quanto ao número de pulverizações, e seu custo, a natureza desse assunto exige maiores estudos, devendo ser verificados por maior prazo, em condições normais das culturas. Os dados considerados nessa questão constituem a primeira informação, sujeitos ás modificações que a pratica indicar.

### INFLUÊNCIA DA PULVERIZAÇÃO VERIFICADA EM QUADRADO LATINO

De início, por não existirem melhores indicações, foi mister verificar si de fato, em condições naturais, as brocas adultas seriam afetadas pelos inseticidas. Ao mesmo tempo pretendeu-se observar qual dos arseniatos comuns teria efeito mais intenso. Para isso, num campo previamente escolhido, e infestado artificialmente para maior

segurança, uma plantação tal como se faz usualmente, foi disposta num quadrado latino de 16 parcelas. Nesse agrupamento as parcelas, de área equivalente a 96 ms.$^2$ cada uma, ficaram, depois do desbaste, com mesmo número inicial de plantas. Entre todas as parcelas conservou-se uma separação de 2,40 ms. Três inseticidas, o arseniato de calcio (40,18% $As^2O^5$ comb. 43,93% CaO), o arseniato de chumbo (32,2% $As^2O^5$ comb. 55,3% PbO) e o verde Paris foram empregados. Em cada grupo de quatro parcelas fizeram-se oito tratamentos, em intervalos regulares de sete dias, não sendo tratadas quatro, para servirem de testemunha. Tanto o arseniato de calcio como o arseniato de chumbo foram empregados na dosagem de 300 gramas para 100 litros de agua; o verde Paris usou-se na dose de 250 gramas para idêntico volume de liquido; as aplicações foram feitas com um pulverizador de costas. Os tratamentos foram iniciados a 2 de Dezembro, um pouco tardiamente, depois do desbaste, quando as plantas já ofereciam todas as condições para franca atividade da praga, tendo cerca de 25 cms. de altura. Nessa ocasião, cerca de 5% das plantas já tinham larvas, não se conhecendo de fato a porcentagem de infestação das portadoras de ovos.

As pulverizações iniciais não foram bem conduzidas, corrigindo-se a técnica mediante as observações feitas no correr dos tratamentos. Além desses dois pontos que contribuiram para prejudicar os resultados, será preciso considerar o inconveniente representado pelos lotes testemunhas. Eles favoreceram a livre atividade da praga, por constituirem fócos permanentes de infestação, que bem considerada, quasi tanto prejudicou os talhões tratados como às proprias testemunhas. Ainda por ser empregado arbitrariamente certa concentração, a dosagem dos inseticidas usados estiveram aquem da porcentagem realmente eficaz. E desde que, pelo confronto posterior da eficácia dos inseticidas, se viu que não guardavam a mesma relação, pode-se estabelecer um complexo de causas que redundaram em detrimento do resultado e que não seriam tão evidentes si o inseticida eficaz tivesse sido o único empregado. Entretanto, apezar desses fatores, os dados obtidos são suficientes para atestar o principal objetivo dessa experimentação, que era verificar a reação da praga ás pulverizações com caldas arsenicais.

Trinta dias depois do primeiro tratamento quando as plantas estavam mais desenvolvidas e portanto os exames podiam ser feitos com mais acerto, iniciou-se a coleta dos dados. Cerca de 15 dias depois computou-se também a população das formas dos indivíduos por planta. Para a obtenção dos dados sôbre a porcentagem de ataque, principalmente porque as plantas atacadas nem sempre exteriorizam os sintomas e porque êsses sintomas muitas vêzes se confundem com o efeito

de outras causas, resolveu-se adotar o critério de arrancar 25 plantas que não manifestassem nenhum sintoma, equitativamente retiradas de cada fileira que constituiam cada parcela. Dêsse modo cada exame de cada tratamento era representado por 100 plantas, havendo-se retirado 600 algodoeiros do conjunto de cada quatro parcelas tratadas ou das quatro testemunhas, no total dos seis exames procedidos. Tal sistema

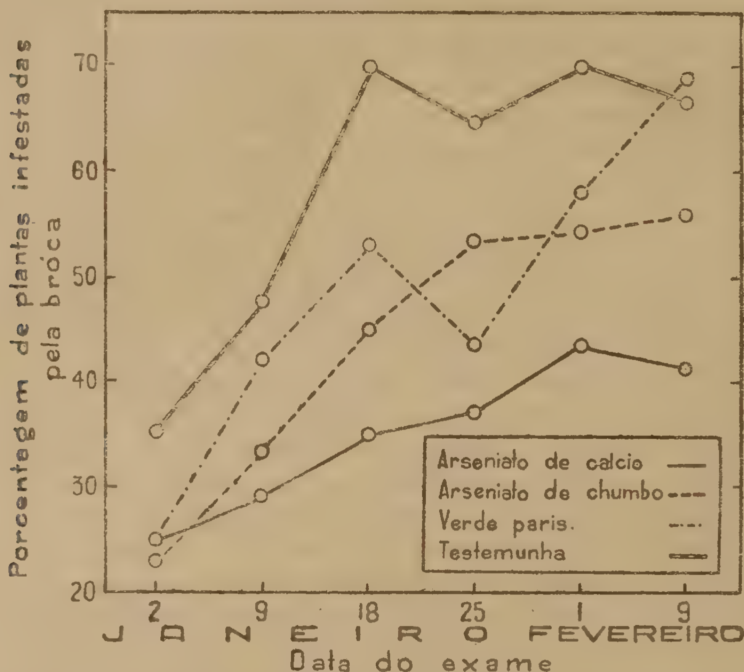



Fig. 1 — Infestação da broca do algodoeiro, *Gasterocercodes brasiliensis* HAMB., nas parcelas do quadrado latino, mostrando as diferenças de ataque obtidas com os diversos tratamentos.

foi satisfatorio e superior ao de se considerar somente o numero de plantas mortas, pois esse não representaria a porcentagem do ataque geral.

Os exames, feitos cuidadosamente, deram os numeros expressos nas tabelas 7 e 8, respetivamente com relação ao numero de plantas atacadas e população dos diferentes estadios do inséto por planta.

Os resultados obtidos dos exames demonstrou, de um modo geral, a ação dos inseticidas, determinando não só a redução da porcentagem de ataque da cultura, fig. 1 como, em consequencia disso, restringiu o numero de individuos por planta.

TABELA 7

Número de plantas infestadas pela broca do algodoeiro segundo os exames procedidos nos diferentes tratamentos feitos no quadrado latino

Campinas, 1939-40

| Tratamento | Parcelas do quadrado latino | Resultado de cada exame do numero de plantas atacadas em 25 algodoeiros examinados por parcela. | | | | | | Infestação em 150 pés (Soma dos exames). |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2:1 | 9:1 | 18:1 | 25:1 | 1:2 | 9:2 | |
| Ars. Cálcio 0,30 % | A 1 | 5 | 5 | 7 | 8 | 12 | 8 | 45 |
| | B 3 | 8 | 4 | 11 | 10 | 8 | 9 | 50 |
| | C 2 | 6 | 7 | 9 | 9 | 11 | 10 | 52 |
| | D 4 | 6 | 12 | 8 | 10 | 12 | 14 | 62 |
| | Total em 100 pés | 25 | 28 | 35 | 37 | 43 | 41 | (209) |
| Ars. Chumbo 0,30 % | A 3 | 7 | 5 | 4 | 12 | 8 | 10 | 46 |
| | B 1 | 6 | 8 | 10 | 13 | 14 | 14 | 65 |
| | C 4 | 3 | 10 | 16 | 16 | 17 | 19 | 81 |
| | D 2 | 7 | 10 | 11 | 12 | 15 | 13 | 68 |
| | Total em 100 pés | 23 | 33 | 41 | 53 | 54 | 56 | (260) |
| Verde Paris 0,25 % | A 2 | 9 | 13 | 13 | 11 | 14 | 14 | 74 |
| | B 4 | 7 | 10 | 16 | 9 | 15 | 20 | 77 |
| | C 1 | 3 | 9 | 11 | 12 | 19 | 18 | 72 |
| | D 3 | 6 | 10 | 13 | 11 | 16 | 17 | 73 |
| | Total em 100 pés | 25 | 42 | 53 | 43 | 64 | 69 | (296) |
| Testemunha | A 4 | 6 | 10 | 19 | 16 | 18 | 14 | 83 |
| | B 2 | 10 | 15 | 16 | 14 | 15 | 20 | 90 |
| | C 3 | 12 | 9 | 17 | 13 | 17 | 12 | 80 |
| | D 1 | 7 | 13 | 18 | 21 | 20 | 20 | 99 |
| | Total em 100 pés | 35 | 47 | 70 | 64 | 70 | 66 | (352) |

TABELA 8

Número de individuos em diferentes fases evolutivas encontrados nos caules atacados obtidos dos diversos exames dos diferentes tratamentos

| Tratamento | Parcelas do quadrado latino | Resultado de cada exame do número de formas da broca encontradas em 25 algodoeiros examinados por parcela | | | | Infestação em 150 pés (Soma dos exames) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 18:1 | 25:1 | 1:2 | 9:2 | |
| Ars. Cálcio 0,30 % | A 1 | 11 | 12 | 19 | 7 | 49 |
| | B 3 | 12 | 14 | 12 | 11 | 49 |
| | C 2 | 12 | 13 | 17 | 7 | 49 |
| | D 4 | 13 | 13 | 20 | 7 | 53 |
| | Total em 100 pés | 48 | 52 | 68 | 32 | (200) |
| Ars. Chumbo 0,30 % | A 3 | 6 | 15 | 13 | 11 | 45 |
| | B 1 | 14 | 16 | 19 | 21 | 70 |
| | C 4 | 20 | 23 | 25 | 32 | 100 |
| | D 2 | 16 | 12 | 19 | 21 | 68 |
| | Total em 100 pés | 56 | 66 | 76 | 85 | (283) |
| Verde Paris 0,25 % | A 2 | 16 | 18 | 20 | 24 | 78 |
| | B 4 | 26 | 13 | 28 | 24 | 91 |
| | C 1 | 16 | 16 | 38 | 21 | 91 |
| | D 3 | 19 | 16 | 29 | 23 | 87 |
| | Total em 100 pés | 77 | 63 | 115 | 92 | (347) |
| Testemunha | A 4 | 29 | 23 | 27 | 22 | 101 |
| | B 2 | 27 | 36 | 19 | 32 | 114 |
| | C 3 | 32 | 19 | 18 | 18 | 87 |
| | D 1 | 32 | 42 | 34 | 38 | 146 |
| | Total em 100 pés | 120 | 120 | 98 | 110 | (448) |

TABELA 9

Diferenças do número de plantas infestadas pela broca do algodoeiro de acordo com a tabela 7 e suas significancias demonstradas pela analise de variance em relação ao efeito dos diversos tratamentos

| Formas | Data do exame | | | | | | | | | | | | Resultado da analise dos dados englobadamente | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2:1 | | 9:1 | | 18:1 | | 25:1 | | 1:2 | | 9:2 | | | |
| | Diferença entre medias | Significancia dos resultados | Diferença entre medias | Significancia dos resultados | Diferença entre medias | Significancia dos resultados | Diferença entre medias | Significancia dos resultados | Diferença entre medias | Significancia dos resultados | Diferença entre medias | Significancia dos resultados | Diferença entre medias | Significancia dos resultados |
| Ars. Cálcio — Testemunha . . . | 1,75 | 0 * | 5.50 | MS * | 8.75 | MS | 6.75 | MS | 6.75 | MS | 6.25 | S | 35.75 | MS |
| Ars. Chumbo — Testemunha . . | 3.00 | 0 | 3.50 | S * | 7.25 | MS | 2.75 | 0 | 4.00 | S | 2.50 | 0 | 23.00 | MS |
| Verde Paris — Testemunha . . . | 2.50 | 0 | 1.25 | 0 | 4.25 | 0 | 5.25 | MS | 1.50 | 0 | 0,75 | 0 | 14.00 | AS * |
| Ars. Cálcio — Ars. Chumbo . . . | 1.25 | 0 | 2.00 | 0 | 1.50 | 0 | 4.00 | S | 2.75 | 0 | 3.75 | 0 | 12.75 | 0 |
| Ars. Cálcio — Verde Paris . . . | 0.75 | 0 | 4.25 | S | 4.50 | 0 | 1.50 | 0 | 5.25 | MS | 7.00 | MS | 21.75 | MS |
| Ars. Chumbo — Verde Paris . . | 0.50 | 0 | 2.25 | 0 | 3.00 | 0 | 2.50 | 0 | 2.50 | 0 | 3.25 | 0 | 9 | 0 |
| ES * | 2.15 | | 1.51 | | 2.14 | | 1.56 | | 1.59 | | 2.12 | | 5.88 | |

* MS = muito significante; S = significante; AS = apenas significante; O = sem significação. ES = erro standard.

## TABELA 10

Diferenças do número da broca do algodoeiro nos diferentes estádios encontrados nos caules, de acordo com a tabela 8, e suas significancias demonstradas pela analise de variance em relação ao efeito dos diversos tratamentos

| Formas | Data do exame | | | | | | | | Resultado da analise dos dados englobadamente | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 18:1 | | 25:1 | | 1:2 | | 9:2 | | | |
| | Diferença entre medias | Significancia | Diferença entre medias | Significancia | Diferença entre medias | Significancia | Diferença entre medias | Significancia | Diferença entre medias | Significancia |
| Ars. Cálcio — Testemunha | 18.00 | MS * | 17.00 | MS | 7.50 | 0 * | 19.50 | MS | 62.00 | MS |
| Ars. Chumbo — Testemunha | 16.00 | MS | 13.50 | S * | 5.50 | 0 | 6.25 | 0 | 41.25 | MS |
| Verde Paris — Testemunha | 10.75 | MS | 14.25 | S | 4.25 | 0 | 4.50 | 0 | 25.25 | 0 |
| Ars. Cálcio — Ars. Chumbo | 2.00 | 0 | 3.50 | 0 | 2.00 | 0 | 13.25 | S | 36.75 | 0 |
| Ars. Cálcio — Verde Paris | 7.25 | S | 2.75 | 0 | 11.75 | S | 15.00 | S | 20.75 | S |
| Ars. Chumbo — Verde Paris | 5.25 | 0 | 0.75 | 0 | 9.75 | S | 1.75 | 0 | 16.00 | 0 |
| ES * | 2.70 | | 4.67 | | 4.23 | | 4.64 | | 12.2 | |

* MS = muito significante; S = significante; O = sem significação. ES = erro standard.

Foi feita a analise de "variance" dos dados contidos nas tabelas 7 e 8 e calculado o erro "standard" das diferenças entre as medias dos ensaios (ES), avaliando-se em seguida a significancia dessas diferenças de acordo com a tabela *t* de FISHER (1), para nove gráos de liberdade. Esses resultados estão contidos nas tabelas 9 e 10, correspondentes respetivamente ás tabelas 7 e 8, e onde MS (muito significativo) se refere a valores de *t* equivalentes a uma probabilidade superior a 99%, S (significante) a uma probabilidade entre 95 e 99%, AS (apenas significante) para valores de *t* visinhos de uma probabilidade de 95% e finalmente O (não significante) para probabilidade inferior a 95%.

Na tabela 7 expressam-se os numeros obtidos em cada exame de cada parcela de cada inseticida empregado, convindo considerar que sob o titulo "parcelas do quadrado latino" as letras constituem as linhas e os numeros as colunas.

Considerando o resultado das análises, quer parciais, quer total, expresso na tabela 9, verifica-se que, com exceção do primeiro exame, onde devido à infestação inicial das plantas certamente os inseticidas não puderam evidenciar a sua ação, nos demais, de acôrdo com o produto empregado, os resultados se manifestaram mais ou menos favoráveis quando confrontados com os dados resultantes das parcelas testemunhas. Assim é que, nesse caso, já nos resultados de cada exame, já no resultado da análise dos dados considerados englobadamente, o arseniato de cálcio mostrou-se evidentemente significante. O de chumbo, si bem que para certos casos não fosse estatisticamente significante, no conjunto dos exames evidenciou a sua significação. As parcelas tratadas com o verde Paris de fato sempre apresentaram aspecto semelhante ao dos lotes testemunhas (Est. 92, fig. *Fb*) e a análise fornece, para o global, um resultado apenas significante.

A tabela 8, cujo arranjo é semelhante ao da tabela 7, consta dos números de formas do inseto encontrados nos caules examinados. A tabela 10, refere-se ao resultado das análises feitas.

Indubitavelmente, pelo aspecto dos talhões, os tratados com o arseniato de cálcio salientaram-se nitidamente, (Est. 92, fig. *E;* Est. 92, fig. *Fa;* Est. 93, fig. *Ga*) o que é confirmado pela análise. Em seguida os lotes tratados com o arseniato de chumbo (Est. 93, fig. *Gb*) apresentaram aspecto melhor do que os pulverizados com o verde Paris.

## DAS PULVERIZAÇÕES — TÉCNICA E NÚMERO DE APLICAÇÕES PROVÁVEIS

O objetivo das pulverizações contra o *Gasterocercodes brasiliensis* HAMBL. visa combater os adultos, de sorte que, pela redução

verificada, ou transtornos ocasionados em suas atividades, seja reduzida a proliferação bem como as ulteriores consequências para as plantas. Em razão do porte, os algodoeiros são, no começo da cultura, mais suceptiveis de serem sacrificados totalmente, do que quando mais desenvolvidos. Então, devido à robustez, adquirem certa capacidade de resistência. A diminuição, portanto, da população de adultos no início e primeiros meses da cultura é sobremodo eficaz e concorre não só para restringir a porcentagem de plantas atacadas, como para reduzir a intensidade do ataque por planta, até que advenham as condições de resistência, facultadas pelo crescimento. As práticas de combate já preconizadas concorrem para a redução dos adultos. As pulverizações, aliadas a essas medidas, segundo as informações preliminares obtidas, conduziram a resultados satisfatórios.

Devido à migração e ao hábito de procurar o inseto as novas culturas para prosseguirem as atividades interrompidas durante os intervalos de cultura e condições menos favoráveis, uma pulverização cedo se impõe. Geralmente a postura se inicia quando as plantas são ainda pequenas, de 8-10 cms. de altura. Pouco mais tarde, quando atingem 12-15 cms. a atividade da praga é franca. Nessa época, porque ainda não ha zonas de alimentação preferenciais, a primeira pulverização, abrangendo toda a planta (Est. 93, fig. *H*), atinge o seu objetivo. Conquanto se considere toda a planta, as porções inferiores das folhas e hastes devem ser as mais visadas. Isso contribue para maior eficiência, pois concorre para conservar o inseticida por mais tempo sôbre a planta.

E' vantajoso impedir que os algodoeiros sofram precocemente os efeitos da praga. Convem, portanto, dada á migração continuada da broca, manter a cultura envenenada. Uma segunda pulverização 25-30 dias depois, também conduzida sôbre toda a planta, mas preferencialmente nas regiões inferiores, (Est. 94, fig. *I*) tal como a primeira, proporcionou bons resultados.

Essas duas primeiras aplicações foram uteis também para manter a cultura livre de outras pragas, como lagartas, grilos, gafanhotos, e de estádios de insétos mastigadores em geral, responsáveis por muitos danos. No decurso dos trabalhos tal fato ficou muito claro. A segunda aplicação contribuiu para que as plantas retardadas ou provenientes do replante ficassem também pulverizadas. A terceira aplicação do inseticida, 40-45 dias depois da primeira, determinou que a cultura continuasse em bom estado, mantendo baixa a infestação. Essa, bem como a quarta, foi dirigida para a região mais proxima do solo (Est. 91, fig. *C*). As três pulverizações efetuadas sómente visaram reduzir os adultos provindos de fóra ou que escaparam das aplica-

ções anteriores. A quarta e última pulverização, feita 85-95 dias depois da primeira, visou principalmente combater os adultos criados na propria cultura e constituintes da primeira geração do campo. Nessa ocasião, pelos exames feitos, a maioria dos adultos haviam nascido e estavam em franca atividade.

Depois dessa última aplicação, já porque as plantas possuissem um desenvolvimento conveniente, sendo capazes portanto de melhor resistir ao ataque da praga, já porque o número de indivíduos se encontrava muito reduzido e a cultura só apresentava poucas plantas visivelmente sacrificadas, não se julgou necessaria outra pulverização.

No entanto a parte relativa ao número de pulverizações ainda depende de mais numerosas observações; aparentemente, supõe-se que de 3 a 5 pulverizações deverão ser feitas, nos locais onde o ataque mais se evidencie. A quinta aplicação teria o fim de, aplicada tardiamente, proporcionar maior redução de população dos adultos criados no decorrer da cultura, de modo a restringir mais ainda o número dos que pudessem atravessar o inverno e infestar a cultura seguinte.

Para êsses trabalhos um algodoal de cerca de 18.000 ms.$^2$ foi utilizado e confrontado com área equivalente de um campo proximo, que se considerou como testemunha, tendo-se usado o arseniato de cálcio $\left(\begin{matrix}40,8\% \; As^2 O^5 \text{ comb.} \\ 43,93\% \; CaO\end{matrix}\right)$ em solução a 0,60%. Na área tratada evidenciou-se que o número de plantas sacrificadas foi incomparavelmente menor e o estado da cultura, com relação à broca do algodoeiro, muito melhor. Em exames feitos em 500 plantas, retiradas dêsse campo, confrontadas com outras tantas da área testemunha, notou-se que, enquanto havia no primeiro 98 adultos ou formas desenvolvidas que dariam uma geração muito prejudicial à cultura, no testemunha obtiveram-se 279 formas nas mesmas condições; isso significa 0,196 indivíduos por planta na área pulverizada e 0,558 no campo testemunha, isto é, uma população cerca de duas vezes e meia maior, por planta. Até os quatro primeiros meses a infestação do testemunha atingiu 74%, ao passo que foi mantida no lote pulverizado a menos de 32%. Depois dessa época a porcentagem cresceu e no fim da colheita, praticamente, ambas as culturas apresentavam idêntico grau de ataque. No entanto, nas plantas da área tratada os caules não sofreram as deformações típicas dos não tratados, e a infestação era constituida de formas muito jovens, produto de recente infestação.

Nesse trabalho preliminar considerou-se a praga, não se atendendo á colheita, que por motivos supervenientes não pôde ser computada. Foi notado entretanto que no campo testemunha o "shedding" foi tão pronunciado como o que normalmente se verifica; na área pulverizada foi menos evidente.

Aparentemente existe uma relação intima e uma proporção direta entre os algodoais enfraquecidos pelo ataque da broca e o "shedding", fato que interessará os estudos futuros.

O custo de cada pulverização, nas condições dessa experiência, calculado na base dos 18.000 ms² (Est. 94, fig. *J*), com arseniato de calcio em solução a 0,60%, e computados todos os elementos, ficou em cerca de 43$400 por alqueire de 24.200 ms.².

## PRELIMINARY RESULTS OF EXPERIMENT IN COMBATTING THE COTTON BORER, "GASTEROCERCODES BRASILIENSIS HAMBL." (Col. Curc.) BY MEANS OF ARSENICAL SPRAYS

### *Abstract*

*The cotton borer, Gasterocercodes brasiliensis* HAMBLETON, *is one of the cotton pests whose economic importance is outstanding due principally to the difficulty of combatting it effectively. The usual methods employed are not entirely satisfactory due to the habits of this insect.*

*In this paper the author describes the activities of the pest during and after the cultural period and gives data on its biology and habits in relation to methods of control. The possibility of a new method of combatting this pest by means of sprays with arsenical poisons was derived from the study of the biology and activities.*

*Field and laboratory experiments during 1939-40 were conducted (1) to determine the effects of the arsenical poison on the cotton borer and the reactions of the pest, (2) to compare the effects of insecticides on the adults as a possible means of controlling the insect with poison sprays and (3) to determine the time and number of applications and the cost.*

*Infestation records secured from 16 small plots arranged in a latin square indicate that calcium arsenate was more effective than lead arsenate and Paris green.*

*The infestation record obtained after the 4th month from an area of about 18.000 sq. mts. sprayed with calcium arsenate in water (0,60%) was reduced to 32% while in a similar untreated plot the infestation was about 74%. It was evident that in the treated area the growth was incomparably better and apparently the shedding was reduced in comparison with the untreated check.*

*The laboratory tests proved that the feeding of the adults was reduced and the insects rapidly became victims of the effects of the in-*

*secticides. Apparently the females fed slightly more than the males, however the proportion of deaths was about equal between the two sexes over an indentical period.*

*After the intoxication all the activities dropped abruptly.*

*In the testing of three insecticides under laboratory condictions the results obtained confirmed the primary results with calcium arsenate and demonstrated that this was more effective than the lead arsenate and aluminium arsenate. In the test dosage of 500 grams of calcium arsenate for 100 liters of water proved efficaceous.*

*In the field tests plants were artificially infested with adults and then sprayed under control with calcium arsenate. With this dosage on the 5th day after treatment an average 91,7% of the insects were killed and on the 10th day 98%.*

*The time and preferency of the aplications is not yet determined definitely. But the first results were obtained by making four applications during the cultural season, starting when the plants are 12-15 cms. high and the three others at intervals of about 25-30 days.*

*The sprays should be applied, except the first one which should cover the entire plant, only to the lower region of the plant to which portion of the plant the insect attack is confined.*

*The cost of treatment, based on data obtained in the spraying of 18.000 sq. mts. is 43$400 per alqueire paulista (24.200 sq. mts.).*

## BIBLIOGRAFIA

1 — FISHER, R. A. — 1933 — Statistical Methods for Research Workers. Oliver & Boyd, Edinburg.

2 — HAMBLETON, E. J. — 1937 — A Broca do Algodoeiro no Brasil Gasterocercodes brasiliensis HAMBL. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 8, 47-106, c/ figs.

3 — HAMBLETON, E. J. & SAUER, H. F. G. — 1938 — Observações sôbre as Pragas da Cultura do Algodoeiro no Nordeste e Norte do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 9, 319-330.

4 — PYENSON, L. — 1938 — The Problems of Applied Entomology of Some of Pests of the Crops in Pernambuco. *Rev. de Entomologia*, 9, 16-31.

5 — PYENSON, L. — 1938 — Notes on the Biology of the Cotton Borer in Pernambuco, Brasil. *Jour. Econ. Entom.*, 31, 553-557, c/ figs.

———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 90

Fig. *A* — Algodoal muito atacado pela broca do algodoeiro *G. brasiliensis* HAMBL. Essa cultura, plantada cedo, não produziu 30 arrobas por alqueire. (B. MAZZA fot.).

Fig. *B* — Caules de algodoeiros mostrando a alimentação dos adultos do *G. brasiliensis*. *a*) porções inferiores dos caules; *b*) partes superiores, onde se vê que os adultos, em vez de perfurar, raspam a superficie do caule. (B. MAZZA fot.).

### Estampa 91

Fig. *C* — Pulverização de algodoeiros. Nesse tamanho, as pulverizações deverão ser dirigidas para as porções mais baixas da planta. (AUTOR fot.).

Fig. *D* — Os caules pulverizados foram protegidos com manilhas de barro, afim de ser mantida a praga em contacto com as plantas. (AUTOR fot.).

### Estampa 92

Fig. *E* — Parcela do quadrado latino tratada com arseniato de cálcio. O estado e desenvolvimento dessas parcelas foi muito melhor que as demais, onde outros tratamentos foram feitos. (B. MAZZA fot.).

Fig. *F* — Parcelas do quadrado latino: em *a*, ao fundo, lote tratado com arseniato de cálcio; *b*, testemunha. (B. MAZZA fot.).

### Estampa 93

Fig. *G* — Trecho do quadrado latino onde foram feitas as experiências de pulverizações, vendo-se em *a*, lote tratado com arseniato de cálcio, em *b*, com arseniato de chumbo, e em *c*, testemunha, não tratado.

Fig. *H* — A primeira pulverização nas plantas pequenas deve ser dirigida sôbre toda a planta.

### Estampa 94

Fig. *I* — Na segunda pulverização convem que o jato se dirija ás partes inferiores.

Fig. *J* — Algodoal pulverizado contra a broca do algodoeiro. Na área de 18.000 ms.$^2$, até os quatro primeiros meses a infestação, não foi superior a 32%. Muito poucas plantas morreram pelo ataque da broca, tendo sido muito reduzida a população de indivíduos por planta.

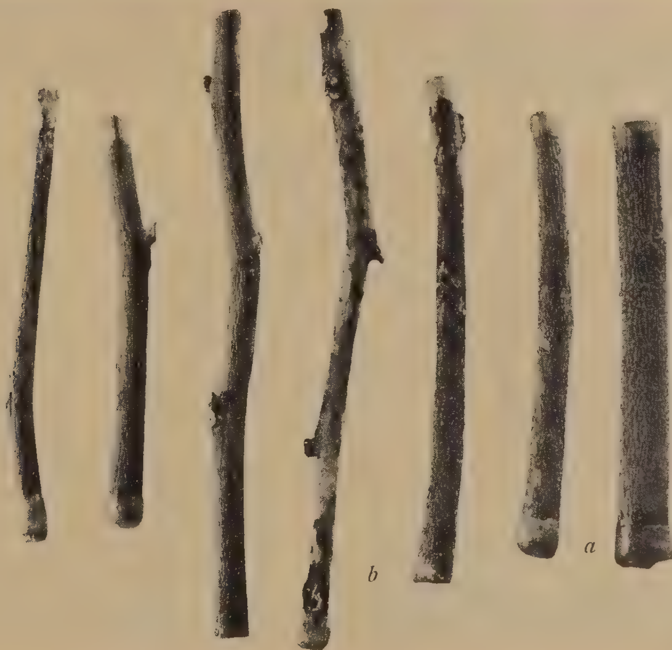
### Estampa 95

Para a obtenção de adultos para as experiências, caules atacados foram arrumados na parte superior dessa gaiola. Colocando-se caules verdes na parte inferior, as brocas eram atraídas pelo alimento, facilitando muito a coleta do material.

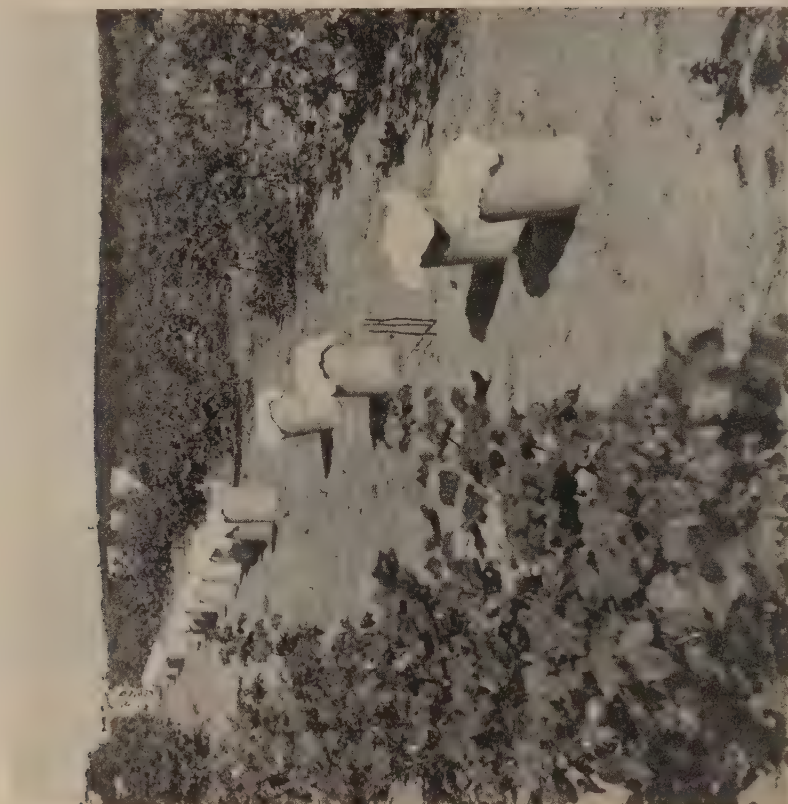
———o———



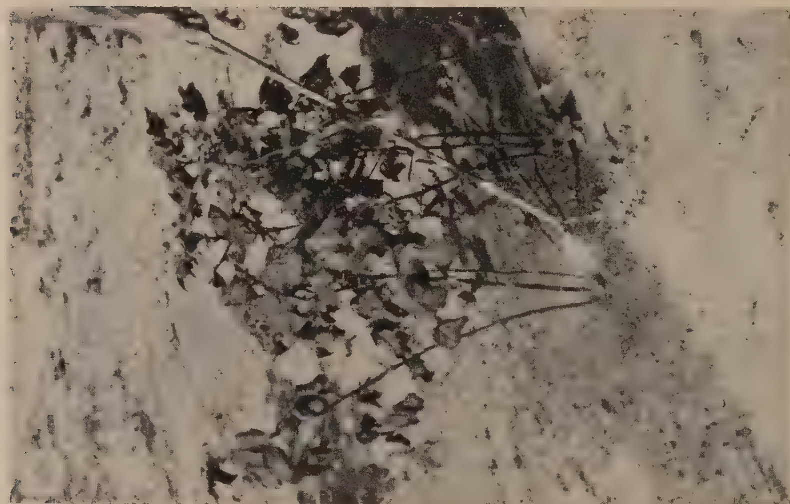
A




B



D



C




*E*




*F*




G



H



I



J



# WAS LEISTET DIE TECHNIK DER "BIOLOGISCHEN LEUKOCYTENKURVE"?

VON

Prof. Dr. Viktor Schilling

Direktor der Medizin. Universitätsklinik Münster, Westfalen

Zu der Zeit, als Prof. Dr. ROCHA LIMA zum Mitarbeiterstabe des Hamburger Instituts für Schiffs- und Tropenkrankheiten gehörte, war Verfasser am gleichen Institute mit den grundlegenden Untersuchungen über die Wandlungen des Leukocytenbildes im Verlaufe einer Krankheit beschäftigt. Damit wurde die bisherige Annahme, dass jeder Krankheit oder doch Krankheitsgruppe ein ihr eigentümliches, lehrbuchmässig anzugebendes Leukocytenbild zukomme, erschüttert. Es war bis dahin sehr einfach, zu sagen, dass der Malaria eine Grossmononukleose oder Monocytose, der Tuberkulose vorwiegend eine Lymphocytose, akuten Krankheiten, wie Fleckfieber, eine neutrophile Hyperleukocytose, dem Leberabszess eine langdauernde Neutrophilie, der Filiariose eine Eosinophilie entspräche. Es darf daher in dieser Festschrift einmal kurz der weitere Gedankengang und das jetzige Endergebnis dieser neuen Betrachtungsweise aufgezeigt werden, das aus dem damaligen Satze (Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene Bd. 16. Beiheft IV. S. 445 (159) geworden ist: "nicht mehr nach einzelnen, angeblich charakteristischen Elementen haben wir zu suchen, sondern der ganze, im Augenblick vorhandene Gesamttypus des Blutbildes sollte uns Aufschluss geben, an welcher Stelle einer regel-und gesetzmässig wiederkehrenden Folge von biologischen Blutvorgängen wir uns gerade befinden".

Nach zahlreichen Untersuchungen auf dem ganzen Gebiete der Medizin, nicht zum wenigsten aber auch gerade an den akuten tropischen Infektionskrankheiten mit ihrem zu berechnenden Zeitpunkt der Ansteckung, entstand daraus der Lehrsatz der "Biologischen Leukocytenkurve" in der heutigen Form:

"Bei den meisten Infektions- und Intoxikationsprozessen folgen dem Reiz zuerst die Neutrophilen, dann die Monocyten, zuletzt die Lymphocyten; die Verschiedenheit der infektiösen Blutbilder beruht auf zeitlicher Verschiebung dieser drei Phasen gegeneinander und auf der

wechselnden Stärke der Reaktion in den einzelnen Gruppen, bezw. auf dem Auftreten seltener Zellformen neben ihnen."

Waren hiernach zuerst die regelmässigen "typischen" Abläufe der biologischen Kette von Blutbildern von grösserem Interesse, s. z. B. Fleckfieber, bis das Wesen der Erscheinung und ihre wirkliche Gesetzmässigkeit feststand, so sind es jetzt schon die "atypischen" Abläufe, die das grössere Interesse beanspruchen. Eine kleine Sammlung solcher "atypischen biologischen Leukocytenkurven" sind durch Vermittlung des Generalsekretärs Prof. Dr. M. CHEDIAK dem VII. Panamerikanischen Kongress, Seccion de laboratorio clinico, 1938 vergelegt worden.

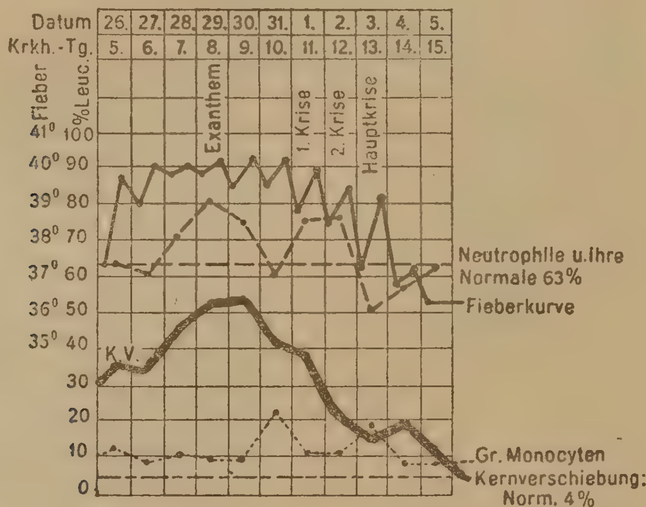



Abb. 1 — Phase I (Kampfphase) und II (monocytäre Abwehr in der Krisis) bei Fleckfieber.

Für den regelmässigen "typischen Ablauf" haben uns zwei Krankheiten der warmen Länder das beste Modell geliefert:

*a*) die Malaria, mit der wir dank der WAGNER-VON JAUREGG'schen künstlichen Malaria-Behandlung am Menschen direkt experimentieren konnten (Verfasser mit JOSSMANN, HOFFMANN, RUBITSCHUNG und VAN DER SPEK, Z. f. klin. Med. Bd. 100, 1924).

*b*) das Rekurrensfieber, mit dem SAGEL (Z. f. klin. Med. Bd. 101, 1925) ebenfalls bei der Paralysebehandlung die längste regelmässig durchgeführte "biologische Leukocytenkurve" gewann.

Die Malariakurve einer künstlichen *Tertiana quotidiana,* vierstündlich über drei Tage und Nächte fortgeführt (RUBITSCHUNG), bestätigte zunächst auch bei dieser angeblich "monolymphocytären Infektion" den typischen Wechsel der Leukocytenbilder. Im Schüttelfrost und auf der Fieberhöhe entwickelte sich drei mal die neutrophile Kampfphase I mit starker "regenerativer" Kernverschiebung, im Fieberabfall trat eine oft starke Monocytose als "monocytäre Abwehr- oder Überwindungsphase II" auf und im fieberfreien Intervall erhoben sich Lymphocyten und Eosinophile zur "lymphocytär-eosinophilen Rekonvalescenz-Phase III". Allerdings war die Basis der Reaktion eine andere als die normale. Es ergab sich aber bestimmt, dass nicht eine feste, spezifi-

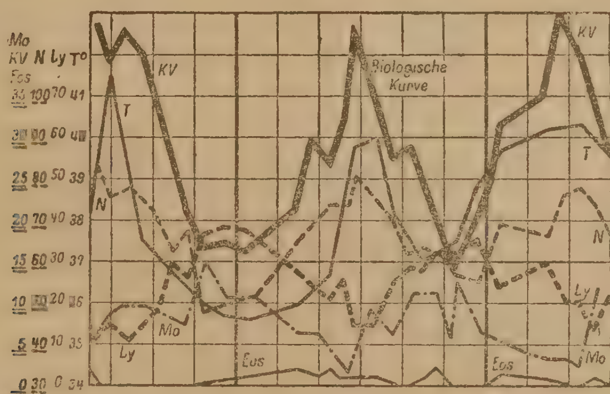



Abb. 2 — Periodische Folge der Phasen I-III bei drei Malaria-Anfällen. Starke neutrophile Phase I in der Akme, monocytäre Phase II in der Krisis, lymphocytär-eosinophile Phase im Interall.

sche Form der Leukocytenreaktion vorlag, sondern dass die allgemeine Regel galt, mochte auch die Makrophagocytose der zerfallenden Teilungsbestandteile die besonders deutliche Monocytose mitverstärken. Eine ähnlich starke monocytäre Reaktion fand sich aber auch bei nichtparasitären Krankheiten wie Tuberkulose und *Endocarditis lenta,* wenn nur der Fiebertypus sich dem remittierenden Malariaverlauf näherte.

Die Wechselbeziehungen zwischen Erreger und Körperabwehr bestimmten den zeitlichen Ablauf; die Reihenfolge der Bilder aber entsprach einem allgemeineren Gesetz, das sich in gleicher Weise im Entzündungsvorgang wider-

spiegelt: erst wandern die Neutrophilen zu; dann treten die grossen mesenchymatösen Makrophagen auf und bemächtigen sich der geschädigten Granulocyten; zuletzt bleibt eine kleinzellige Lymphocytose und unter Umständen auch Eosinophilie als Restzustand zurück, bis die völlige Heilung erzielt ist.

Mehr in letzter Zeit beachtet wurden die Erscheinungen der Allergie. Sowohl die schockartige Leukopenie, wie die starke monocytäre Reaktion gehören zu den Syndromen des allergischen Prozesses und finden sich im Tierexperiment mit periodisch sensibilisierten Tieren wieder, als auch tritt die mesenchymatische Reaktion im histologischen Präparate als dem allergischen Entzündungsbilde entsprechend hervor (RÖSSLE, KLINGE u. a.).

Der periodisch aufflackernde Krankheitsprozess bewirkt sichtlich eine allgemeine Hyperergie, die den einfachen einmaligen Infektionsprozess, wie ihn z. B. das Fleckfieber kennzeichnet, in der "biologischen L.-Kurve" schon modifiziert.

Die SAGEL'sche Rekurrenskurve (l. c.) zeigte dann in sehr demonstrativer Weise, dass tatsächlich mit jedem weiteren Anfalle die Basis der monocytären Reaktionen verändert wird: während des ersten Anfalles erheben sich die Monocyten in jeder kurzen Pseudokrise, nach dem zweiten Anfalle erreichen sie ihre höchste und kräftigste Reaktion im Fieberabfall und im dritten Anfall zeigen sie ein heftiges unregelmässiges Auf- und Abwogen.

Aus diesen Lehren entwickelte sich dann das Verständnis für das chronische Bild, das je nach dem klinischen Ablauf der Krankheit, der Virulenz und Giftigkeit, sowie der Form der Symbiose mit dem Kranken, eine der "neutrophilen Kampfphase I", der "monocytären Abwehrphase II" oder der "lymphocytär-eosinophilen Heilphase III" entsprechende, etwas veränderte Grundbasis für jede Exacerbation oder sogar das typische Bild der betreffenden Phase für die Dauer zeigen konnte.

So war die Neutrophilie des Leberabszesses chronische Phase I, das Intervallbild der Protozoeninfekte, Monocytose, die Phase II, die bekannten Lymphocytosen der typhusähnlichen chronischen Infekte, des Maltafiebers, der *Trypanosomiasis*, der *Syphilis* etc. die verlängerte Rekonvalescenzphase III. Eine Exacerbation dieser Prozesse spielte sich dann jeweils auf der veränderten Basis ab, dem ja auch das innere Zustandsbild der hämatopoetischen Organe entsprach und musste damit Abweichungen von der typischen Kurve ergeben.

Einige Schwierigkeiten schien zunächst die Eosinophilie zu machen. Zwar musste man nach der obigen Erklärung gerade in den chronisch-remittierenden Prozessen Eosinophilien erwarten und kannte sie auch bei der chronischen Malaria als gelegentlich vorkommend gut. Man berücksichtigte nur nicht hinreichend die biologischen Regeln für das Zustandekommen der eosinophilen Leukocytosen und Leukopenien, um diesen Wechsel richtig zu deuten.

Das reinste Paradigma der chronischen allergischen Eosinophilie liefern die Filariosen und die tropischen Wurmkrankheiten. Je wenigar toxische Reizphânomene, wirkliche fieberhafte "Entzündungen" durch einen perio-

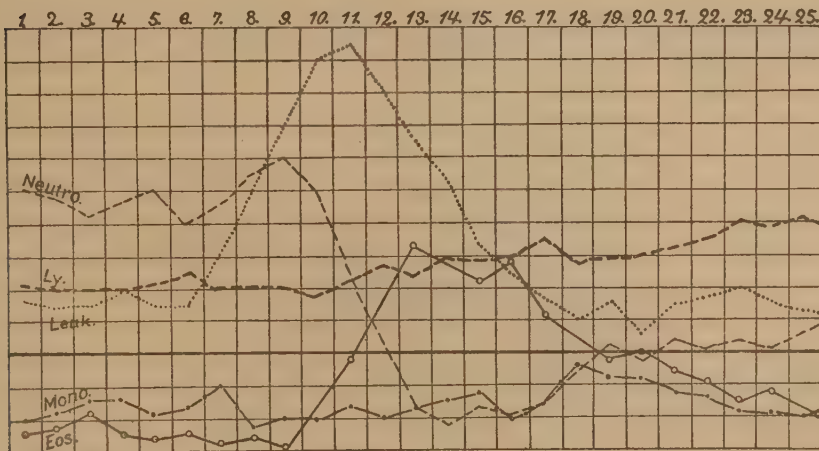



Abb. 3 — Experimentelle Trichinellen-Infektion der Ratte (nach Kramer). Die K. V. ist fortgelassen. Vom 10.-22.Tage erst hohe eosinophile Reaktion.

disch einverleibten fremden Eiweisskörper ausgelöst werden, um so reiner pflegt sich das atypische Bild der "eosinophilen biologischen Leukocytenkurve zu entwickeln. Eine gewisse "Spezifität" des Wurmeiweises lässt sich dabei nicht leugnen und es gelingt experimentell am leichtesten, hiermit die natürlich entstehenden Prozesse nachzuahmen (z. B. mit Trichinellen) vielleicht, weil, wie bei der chronischen Filariose, sonstige Vergiftungssymtome klinisch fortfallen; aber wir finden sie gelegentlich auch bei tuberkulösen und anderen Prozessen. Ganz besonders aber muss beachtet werden, dass bei jeder zu starken hyperergischen Reaktion die periphere Eosinophilie verschwindet, wahrscheinlich durch rasche Vernichtung des geringen Vorrates der kreisenden Eosinophilen, wie die dann oft anzutreffende

starke Knochenmarkeosinophilie klar erkennen lässt. In anderen Fällen mag wirklich eine Aplasie eben dieses besonders betroffenen Systems eintreten, (wie wir heute schon die eigenartige, die Neutrophilen vernichtende Amidopyrin-Agranulocytose kennen) und auch das Knochenmark ist überraschend leer von ihnen trotz einer sicheren Wurminfektion.

Die "biologische Kurve" zeigt nun z. B. bei einer künstlichen Ratteninfektion mit Trichinellen (KRAMER), dass trotz der Ansteckung zunächst die Eosinophilie ganz fehlt, dafür aber eine neutrophile Hyperleukocytose eintritt (Kampfphase I). In diesem Stadium überwiegt der entzündliche Reiz der sich einnistenden Infektion und es fehlt noch die zur Allergie notwendige Sensibilisierung. Um die Zeit der üblichen Phase II aber setzt eine immer steigende und die Neutrophilen herabdrückende Eosinophilie ein, eine allergische Abwehr gegen das fremde Eiweiss. Die monocytäre Phase stetzt nur langsam ein und zieht sich in mehreren Schüben über längere Zeit hin (allergische Form der Phase II nach Kenntnis von der Rekurrenskurve SAGELS). Endlich folgt auch hier mit völligem Absinken der Eosinophilie eine lymphocytäre Phase III.

Dieser abweichende Verlauf der Biol. Leukocytenkurve wurde schon vorher gefunden bei Scharlach, nach manchen Milzexstirpationen, bei tuberkulöser Pleuritis; beispielhaft zeigte er sich bei Durchbruch eines *Echinococcus* in die Bauchhöhle (s. Festschrift für Nocht, Abh. a. d. Geb. d. Auslandkunde, Hamb. Univ. Bd. 26. Reihe D. Medizin Bd. 2, S. 485). Es ist der Typus der "allergischen Kurve bei Sensibilisierung mit geeigneten Eiweissstoffen", die nicht zu stark entzündungerregend wirken und dadurch die Eosinophilen herabdrücken, wie dies regelmässig in der typischen Kampfphase geschieht. Auch zu starke Überschwemmung mit dem Antigen hat die gleiche herabdrückende Wirkung. In Berücksichtigung der Kurve wird nun das wechselnde Verhalten der Eosinophilen bei Wurmkrankheiten und anderen sensibilisierenden Infektionen ganz verständlich: sie fehlen im Beginn, bleiben aus bei zu starker und komplizierender entzündlicher Infektion und sinken ab nach Gewöhnung. Danach ist positive Eosinophilie als klinisches Symptom hoch, fehlende nie gegen die Annahme einer allergisierenden Infektion zu verwerten.

Auf die besonderen Typen der Kurve, die sich aus der Reizung bestimmter Zellsysteme ergeben, wie bei der "lymphatischen Reaktion", die mindestens teilweise histiocytäre Zellen in die Blutbahn wirft, und einigen anderen Krankheiten, die die "Plasmazellen und Reizformen" aktivieren, will ich an dieser Stelle nicht eingehen. Ebenso werden die abnormen Typen übergangen, die durch Leukämien, Tumorengeneralisierung im Knochenmark, Myelome und Plasmocytome, Lymphogranu-

lom sich ergeben. Vielleicht gehören fortgeschrittene Kala-azar-Fälle, deren Knochenmark fast völlig durch die Protozoeninvasion zerstört ist, zum Teil in diese Gruppe, wenn sie Ausschwemmung von jungen Knochenmarkzellen und Retikulumzellen erkennen lassen. (Verdrängungsaleukien oder "panmyelophthisen"). Erwähnt seien noch die "leukämoiden Ausschwemmungsleukocytosen" des Schwarzwasserfiebers, bei denen mit der gewaltigen Erythropoese zahlreiche junge Leukocyten bis zu den Myelocyten und Promyelocyten in die Peripherie gerissen werden können. Alle diese Kurven

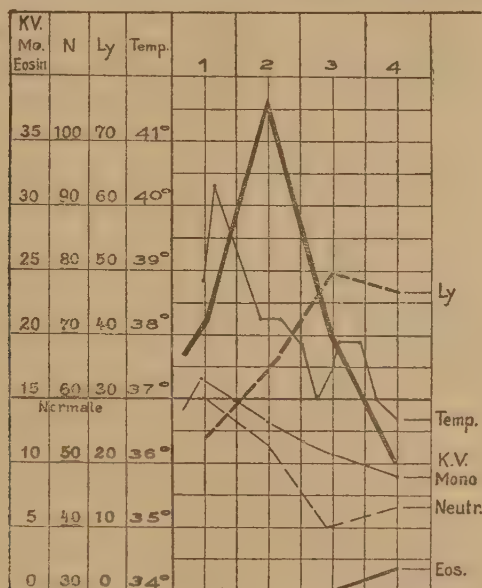



Abb. 4 — Pappatacikurve. Schockähnliche Zusammendrängung der Phasen; Überlagerung der Phase I durch II und III schon im Beginn.

weichen ab von der Regel der normalen Formen und zeigen entweder die Beimischung der fremden Elemente ganz vorübergehend oder über sehr lange Zeiten ohne den davon unabhängigen Rythmus der drei Hauptphasen. Sie sind Abweichungen durch Störung der Tätigkeit der hämatopoetischen Organe und können deshalb sich nicht an die biologische Regel halten.

Wichtig für die Tropenkrankheiten sind aber wieder die Schocktypen.

Bei jeder starken Einwirkung auf die kreisenden Blutzellen kommt es zum Leukocytensturz. Wir sahen die Einmischung

dieses Phänomens schon im Malariaanfall, bei dem der Teilungszerfall wie eine plötzliche Injektion wirkt. Ziemlich oft sinkt im Schüttelfrost die Gesamtzahl erheblich ab und es tritt relative Neutropenie oder Lymphocytose ein, auch wenn dabei die Kernverschiebung die starke Reizung des neutrophilen Systems anzeigt.

Ganz charakteristisch ist das leukopenische Bild des plötzlichen Pappataci-Anfalles. Manchmal überwiegen die Monolymphocyten sofort relativ; in anderen Fällen besteht trotz der niedrigen Zahl von 3-4000 L noch Neutrophilie; immer aber zeigt eine starke Kernverschiebung die bestehende schwere Reizung des neutrophilen Systems an. Diesem Pappataci-Typus nähern sich vielfach die Blutbilder sehr akuter Erkrankungen besonders durch ultravisibleVirusarten (Dengue, Gelbfieber u. a.) und vor allem die Kurven nach medikamentösen Injektionen.

Auch in diesen Fällen verleugnet sich die Grundregel nicht, nur dass durch den abnorm schnellen Ablauf die Phasen gleichsam ineinanderfliessen und durch die Schockleukopenie überlagert werden. Daraus entspringt der Eindruck eines spezifisch abweichenden Leukocytenbildes mit Leukopenie und Lymphomonocytose, da man praktisch meistens in diesem Stadium zur Blutuntersuchung kommt.

Dauert der Schock länger an, wahrscheinlich durch vorherige Sensibilisierung oder Idiosymkrasie, so entsteht das ganz abweichende Bild der "Agranulocytose" W. SCHULZ, der "malignen Neutropenie" (Verfasser, BOCK u. a.), der wir auf dem Gebiete der Tropenkrankheiten besonders nach Injektionen starker Medikamente begegnen z. B. nach Wismut, Antimon, Neostibosan, Mesurol (W. SCHULZ; STEINERT; AUBERTIN; BLANCSTEIN und LEHMANN), nach Arsenobenzol, Salvarsan, Neosalvarsan (STEINERT; KATSUNUMA; MATHHES; MÖSCHL; SAKURAI u. a.), nach Chinin (BEIGLBÖCK u. a.), Prontosil (JANNINGS und SOUTHWELL-SANDER, NITTI, ROVET et DEPIERRE, HARVEY and JANEWAY, YOUNG u. a.).

Hier erscheint über Tage, in einigen Fällen über Wochen bis zum tötlichen Ausgang, eine gänzlich atypische Kurve mit hoher relativer Lympho-Monocytose, die erst während der Heilung sehr rasch wieder in den üblichen Typus der Phase I umschlägt und dann typisch weiter verläuft. Während dieses Umschlages können höhere Zahlen von sehr jungen Knochenmarkformen auftreten, die das Bild anfangs sehr leukämoid gestalten, ja selbst eine kurze Myeloblastose in seltensten Fällen auslösen können. Die toxische Vernichtung der Neutrophilen erstreckt sich in diesen Fällen bis in die hämatopoetischen Organe heinein, zuerst diese, wie die Knochenmarkpunktion bestätigte,

zerstörend und entvölkernd, in anderen Fällen mehr in der Proliferation hemmend, später mit neu einsetzender Granulocytopoese zunächst anarchisierend, bis die erstarkte Neubildung des Markes wieder die typische Kurve unterhalten kann.

Diese kurzen Beispiele mögen genügen, das Prinzip der typischen und atypischen biologischen Leukocytenkurve verständlich zu machen. Der Geübte sieht nun sehr bald bei einem ungewöhnlichen Verlauf den normalen Typus durch die atypische Abweichung hindurch und kann dann deren Entstehung und Verlauf sich erklären. Die anscheinend spezifischen oder charakteristischen leukocytären Infektions-

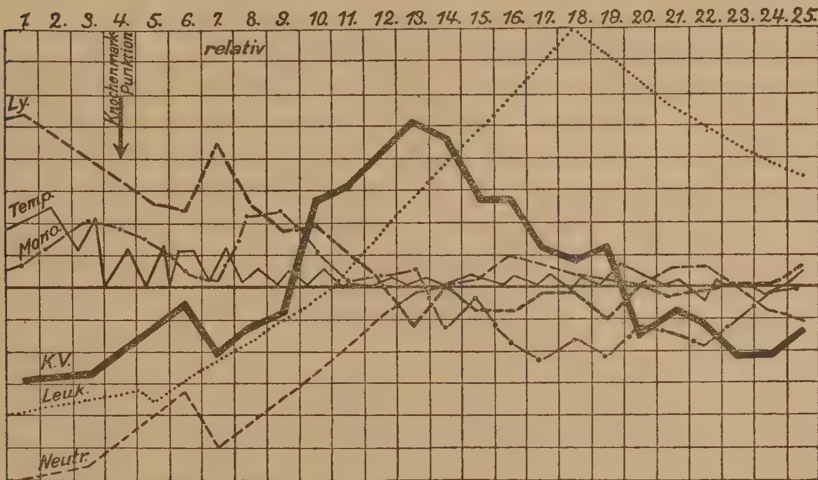



Abb. 5 — Biologische Leukocytenkurve einer "malignen Neutropenie" (Agranulocytose) mit Ausgang in Heilung. 4.-9.Tag Myelocyten, leukämoides Blutbild. Am 4. Tag im Knochenmark Neubildung der zerstörten Neutrophilen (Myeloblasten).

bilder erscheinen nun als Schnittpunkte durch eine biologische Kurve, entweder geordnet an der gehörigen Stelle der Phasen I bis III oder ungeordnet und abweichend, deswegen aber nicht weniger interessant und keineswegs ein Verstoss gegen die Regel, der diese überflüssig oder unrichtig macht (entgegen ARNETH). Hierdurch wird das Phänomen der Leukocytose an sich verständlicher. Wichtiger aber ist, dass aus den nun erkannten Regeln und ihren Abweichungen in der klinischen Beobachtung ursächliche oder prognostische Anhaltspunkte erwachsen, die in wichtigen, schweren Fällen von grösster praktischer Bedeutung sein können.

Vol. 11 — Art. 54 1940

# MEERSCHWEINCHEN ALS LEBENDE SCHNELLFILTER FÜR LEPTOSPIREN

VON

W. Schüffner, Amsterdam

Während Bacterien-Kulturen im Allgemeinen leicht von einer Verunreinigung zu befreien sind, hat das bei Leptospiren seine Schwierigkeiten. Die Kultur auf der Schale, womit man eine Mischkultur von Bacterien sicher in ihre Bestandteile zerlegen kann, fehlt hier, oder ist wenigstens nicht zu gebrauchen. Man ist daher auf Umwege angewiesen, auf Tier-passage, Filtration, und Zentrifugation; vielleicht lässt sich auch mit der Einzellkultur, die neuerdings von MERTENS und MOCHTAR (*) ausgearbeitet wurde, etwas erreichen, wennschon der dazu nötige Apparat nicht jedermann zugänglich ist.

Durch Zentrifugieren allein kann man Leptospiren-Kulturen nur von Bacterien befreien, die unbeweglich sind. Bei beweglichen Bacterien dagegen, etwa Proteus, reicht die Zentrifugation nicht aus, sie wissen sich in der Flüssigkeit ebenso lange wie die Leptospiren zu halten, so dass eine Scheidung nicht zu erreichen ist.

Nachdem festgestellt war, dass Leptospiren feine Bacterienfilter passieren können (für Tonfilter von WALCH, MOCHTAR (**), TIMMERMAN, für Seitzfilter von DINGER erwiesen), wurde diese Methode routinemässig bei uns eingestellt. Man lässt am besten Zentrifugieren vorausgehen, und unterwirft dann die überstehende Flüssigkeit einer Filtration in kleinen Portionen, die unmittelbar in Röhrchen mit Nährflüssigkeit laufen. Damit glückt es in der Regel, wenn die verunreinigte Kultur noch genug Leptospiren enthielt, unter den Filtrat-Kulturen eine oder mehrere rein zu erhalten.

Endlich der Weg über das Meerschweinchen. Die Tiere empfangen von der verunreinigten Kultur etwa 1 ccm intraperitoneal und werden dann beobachtet. Schlägt die Leptospire bei ihnen an, dann kann man noch bei Lebzeiten aus dem Blut durch Herzpunktion Kulturen anlegen. Dies gibt bessere Resultate als die Abimpfung nach dem Tode von der Leber, obwohl man auch damit zum Ziele kommen kann. Den mikroskopischen Nachweis, dass sich die Leptospiren im Blute befinden (der einige Übung und Geduld voraussetzt), kann man sich ersparen, wenn man das Peritoneum kontroliert. Findet man hier am 3. — etwa 8. Tage die Leptospiren-Infektion angeschlagen, dann kann man — nach

(*) Kgl. Niedl. Akademie der Wiss. Proceedings Vol. XLI, N.° 9, 1938.
(**) Z. f. Bact. 107, 1928, Ste. 374.

unserer Erfahrung — sicher sein, dass das Herzblut die Parasiten auch mitführt. Mit 0.1 — 0.2 ccm Blut auf das 3 ccm Vervoort-Nährboden fassende Röhrchen schlägt die Kultur dann gewöhnlich an. Die Methode versagt aber, wenn zufällig die verunreinigenden Bacterien selbst pathogen waren, oder wenn die fragliche Leptospire apathogen oder nicht mehr virulent genug war, beim Meerschweinchen eine Infektion hervorzurufen.

Wir haben daher in den letzten Jahren das Meerschweinchen-Experiment zur Reinigung von Stämmen etwas verändert, von Versuchen ausgehend, die in Leiden von VAN THIEL, in Amsterdam von meinen damaligen Assistenten DINGER und PROCHOEMAN ausgeführt wurden. VAN THIEL (*) brachte Meerschweinchen, deren Bauchhaut rasiert war, eine Stunde lang in ein warmes Bad, dessen Wasser mit Leptospiren infiziert war. Er konnte dann bereits kurze Zeit nach Ablauf des Bades die Anwesenheit von Leptospiren im Herzblut durch Kultur nachweisen. Diese Bademethode wurde von VAN THIEL und seinen Schülern (auch von uns) mit Erfolg angewendet, um natürlich infiziertes Wasser als solches zu erkennen. Bis dahin war es der Mensch, der die Rolle eines Versuchsobjectes, wenn auch unfreiwillig, gespielt hatte, wenn er sich beim Baden oder Sturz ins Wasser eine Infektion mit "Weil" zugezogen hatte. Aber ausserdem hatte VAN THIEL bei seinen Versuchen noch einen anderen Zweck im Auge n. l. nachzuweisen, dass nicht allein pathogene Leptospiren bei seiner Bademethode in den Körper drangen, sondern auch die apathogene *L. biflexa* (die *pseudo-icterogenes* VAN ZUELZER).

In Amsterdam waren es Umwandlungsversuche, wobei als Nebenbefund das Eindringen der *L. biflexa* in die Blutbahn wahrgenommen wurde. Um die Chance des Anschlagens so günstig wie möglich zu gestalten, wurden bei intraperitonealer Einspritzung bisweilen grosse Mengen, bis zur Füllung der Bauchhöhle einverleibt. Man konnte dann 5-10-20 Minuten später die beweglichen Parasiten im Plasma des Herzblutes schwimmen sehen (im Dunkelfeld). Am nächsten Tage waren sie verschwunden, ein Pathogenwerden haben wir (**) ebenso wenig wie VAN THIEL jemals beobachtet.

Es kommt also den Leptospiren, wie man schon lange wusste, eine aggressive Infektiosität zu, d. h. sie besitzen den Trieb und das Vermögen, durch Membranen, Schleimhäute, seröse Häute, ja selbst durch dünne Stellen der cutis zu dringen, um so in die Blutbahn zu gelangen.

---

(*) Ned. Tyd. v. G. 81, N.º 52, pag. 6106-6128, 1937.

(**) s. Sjoeib Prochoeman, Dissertation Amsterdam 1930.

Diese Eigenschaft, die den Bacterien abgeht, oder nur in ganz geringem Masse zu eigen ist, haben wir unserm besonderen Zwecke für Leptospiren dienstbar gemacht. Wir spritzen von der verunreinigten Kultur ca. 0.5 ccm in die Bauchhöhle des Meerschweinchens ein und entnehmen nun 10 Minuten später — erfahrungsgemäss die beste Zeit — durch Herzpunktion 0.5 ccm Blut, das auf 3 Kulturröhrchen verteilt wird. Nach 6 - 14 Tagen sind dann gewöhnlich allein Leptospiren, dank dem Vorsprung, mit dem sie in die Blutbahn gelangten, in Reinkultur gewachsen. Die Resultate, die wir damit in den letzten 3 Jahren erhielten, sind regelmässige und dadurch so befriedigend, dass wir die früheren Methoden ad acta haben legen können.

Das lebende Tier hat hier die Funktion eines rasch und sicher wirkenden Filters. Die Methode ist einfach, und wird ohne Zweifel auch in anderen Händen gute Resultate haben.

---o---

# TRE NUOVE SPECIE DI "MACHILELLUS SILV." (INSECTA, MACHILIDAE) DEL BRASILE

DI

F. Silvestri

Con 3 figure nel testo

Aderendo con piacere al gentile invito dei colleghi ed amici dell'"Instituto Biologico", di S. Paolo di aggiungere anche un mio modesto contributo per il volume, col quale si è stabilito con generale entusiasmo di dare un segno di alta stima al Dr. H. DA ROCHA LIMA, illuminato Direttore dell'"Instituto Biologico", di S. Paolo per aver saputo portare tale istituzione all'altezza delle più grandi della Terra, descrivo in questa nota 3 specie nuove di *Machilellus* SILV., che sono le prime conosciute per il Brasile. Le altre specie di tale genere finora descritte sono 1 di Giava (la tipica del genere), 1 del Messico, 1 delle isole Galapagos e 1 dell'Argentina centrale orientale.

## *Machilellus rochalimai*, sp. n.

Fig. I

♀ Corpus brunneum plus minusve obscurius, antennis brunneis, palpis avellaneis vel stramineis, articulis 2.° ad 5um nigro maculatis, pedibus avellaneis, femoris apice, tibia et tarso brunneo maculatis.

Oculi inter sese tractu quam oculi dimidia latitudo parum longiore tangentes; oculus singulus parum latior quam longior; ocelli laterales latitudine quam oculi latitudo c. ¼ minus lati.

Antennae si integrae quam corpus parum longiores, attenuatae, c. 30-articulatae, articulo primo paullum magis quam duplo longiore quam latiore, articulo secundo parum latiore quam longiore, articulis 3—8 brevibus, articulo 9.° indistincte diviso, articulo 10° distincte in articulinis quatuor et articulis ceteris gradatim in articulinis magis numerosis ut articulus 23us in articulinis 11 divisus apparet, articulis et articulinis omnibus setis brevibus 1—2 seriatis instructis. Palpi maxillares tenues, articulo ultimo quam penultimus parum dimidio breviore, articulo 2.° setis numerosis et sat robustis et superficie supera articulorum 6i et 7i setis spiniformibus consuetis; palpi labiales breviter setosi, articulo ultimo apicem versus introrsum aliquantum elongato, toto subaeque longo atque ad apicem lato.

Thorax arcu dorsuali parum alto; bene convexo; pedibus setis numerosis subtilibus et tibia tarsoque setis robustis nonnullis nigris instructis.

Abdomen. Sterna 2-7 parte sternali mediana brevissima, subcoxis angulo portico externo convexo, stilis segmenti quinti (cum seta apicali), quam subcoxa 2/9 brevioribus, setis subtilibus (ad apicem parum robustioribus) vestitis; segmenti 9i subcoxis quam stili eiusdem segmenti parum longioribus, stilis praeter setas numerosas subtiles, setis internis 3—4 parum robustis auctis.

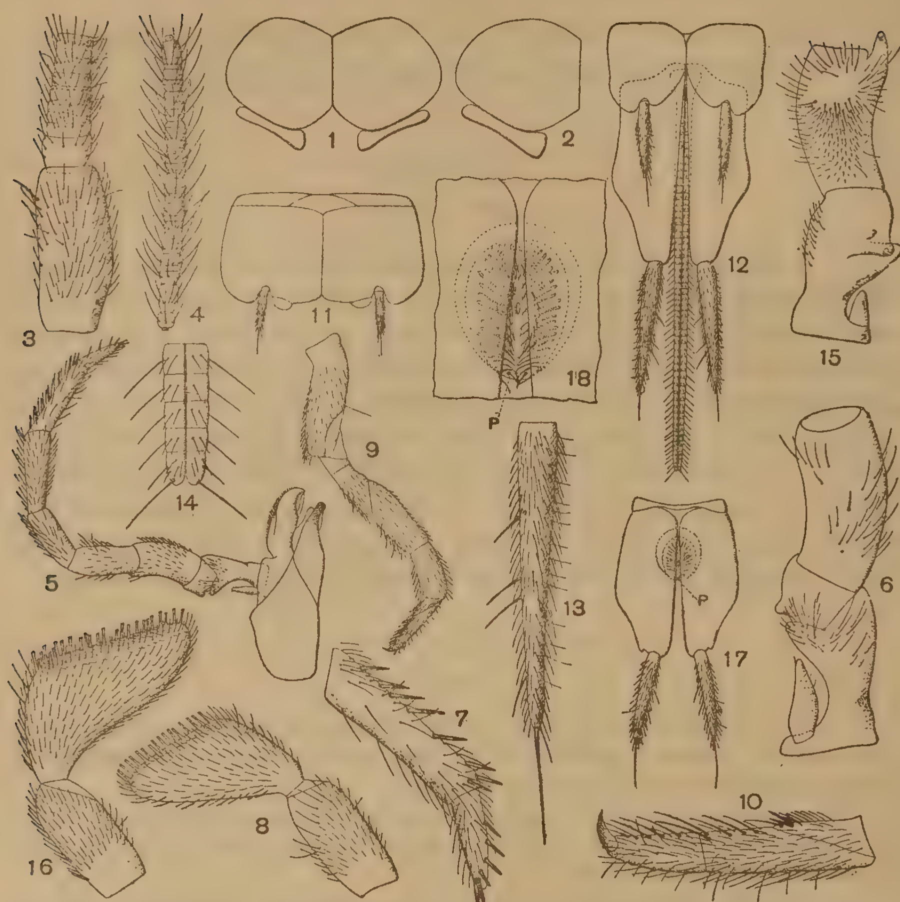



Fig. I — *Machilellus rochalimai*, femina: 1. oculi et ocelli supra inspecti; 2. oculus singulus cum ocello capite aliquantum obliquo; 3. antennae pars proximalis; 4. antennae articulus vigesimus tertius; 5. maxilla primi paris cum palpo; 6. eiusdem palpi pars proximalis magis ampliata; 7. eiusdem palpi articuli penultimus et ultimus; 8. palpi labialis articuli penultimus et ultimus; 9. pes paris tertii; 10. eiusdem tarsus et praetarsus magis ampliati; 11. urosternum 5um; 12. urosterna segmentorum 8i et 9i cum ovipositore; 13. stilus segmenti 9i magis ampliatus; 14. ovipositoris pars distalis supina; 15. maris palpi maxillaris pars proximalis; 16. maris palpi labialis articuli 2us et 3us; 17. maris urosternum 9um cum pene P; 18. urosterni 9i pars cum pene magis ampliata.

Ovipositor tenuis, stilorum segmenti 9i cum seta apicali parum superans, valvulis tantum setis subtilibus instructis. Cerci laterales quam medianus dimidio breviores interne setis spiniformibus proximalibus 4—5 armati; cercus medianus quam corpus paullum brevior.

Long. corporis (sine cercis) mm. 7,5; lat. thoracis 1,9; long. antennarum 8,5, palporum maxillarium 2,50, pedum paris tertii 3,20, cerci mediani 7, cercorum lateralium 3,6.

♂ Corpus statura quam eadem feminae parum minore, palpis labialibus articulo secundo processu unciformi sat magno et eiusdem articuli facie interna setis robustioribus nigris numerosis proximalibus brevissimis et ceteris gradatim longioribus instructa.

Habitat. Exempla nonnulla super arenae cumulos per maris litora ad Itanhaen (Estado de S. Paulo) legi.

Observatio. Species haec, quam animo aestimante et bene auspicante Doctor H. DA ROCHA LIMA dico, ad *M. platensis* SILV. proxima est, sed antennis unicoloris, haud anulatis, oculis minoribus, palpis labialibus articulo ultimo parum introrsum elongato facile distinguenda est.

## *Machilellus cariocus*, sp. n.

Fig. II

♀ Corpus brunneum maculis obscurioribus dorsualibus evanidis, male distinctis, antennarum articulo primo avellaneo, flagello brunneo, palpis labialibus nigro parum maculatis, ore et pedibus praeter tarsos avellaneis.

Oculi inter sese tractu oculi dimidiam latitudinem aequante tangentes; oculus singulus fere 1/5 latior quam longior; ocelli laterales latitudine quam oculi latitudo c. 1/3 minus lati.

Antennae quam corpus (sine cercis) vix breviores, attenuatae c. 35- articulatae setis tantum instructae, articulo primo fere 2/5 longiore quam latiore, articulis distalibus in articulinis 15 divisis, brevibus, setarum seriebus una vel duabus instructis; palpi maxillares setis numerosis parum robustis et setis spiniformibus consuetis per marginem externum articulorum 6i et 7i et 5i apicem instructis; palpi labiales articulo ultimo introrsum aliquantum producto, toto aliquantum ad apicem latiore quam longiore.

Thorax arcu dorsuali parvo, convexo, pedibus setis numerosis subtilibus et per tibiae et tarsi faciem inferam setis nonnullis robustis auctis.

Abdomen. Sterna 2—7 parte sternali mediana brevissima, subcoxis angulo postico laterali late rotundato, stilis segmenti 5i cum seta apicali quam subcoxa c. 2/5 brevioribus, setis subtilibus sat longis numerosis instructis et seta apicali quam stilus fere 1/3 breviore; segmenti 9i subcoxis quam stili (cum seta apicali) eiusdem segmenti parum longioribus, stilis setis numerosis subtilibus et setis 10 parum robustioribus per faciem internam dispositis instructis.

Ovipositor tenuis apice stilorum segmenti 9i setam apicalem fere attingens, valvulis attenuatis, tantum setis nonnullis subtilibus instructis.

Cerci laterales facie interna setis nonnullis robustis subspinoformibus auctis; cercus medianus in exemplo typico haud integer.

Long. corporis mm. 11, lat. thoracis 2,6; long. antennarum 10,5, palporum maxillarium 3,80, pedum paris tertii 3,60, cercorum lateralium 4,60, cerci mediani?

Habitat. Exemplum typicum ad Rio de Janeiro in memore hortis botanici legi.

Observatio. Species haec a praecedente oculis latioribus, ocellis minus latis, palpi labialis articulo ultimo apice latiore saltem distincta est.

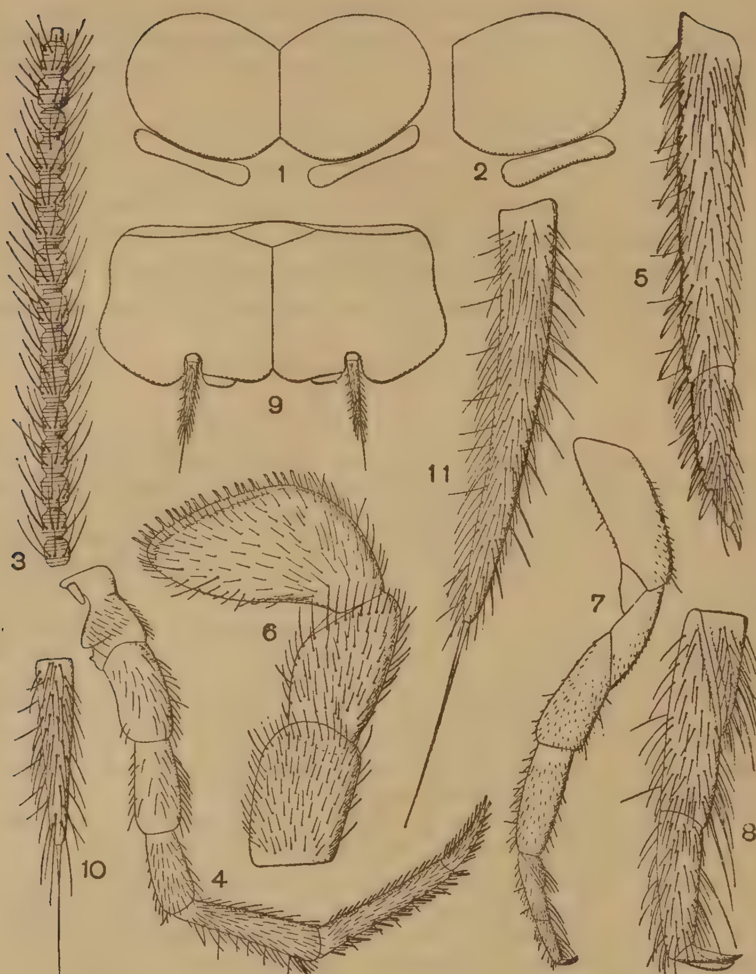



Fig. II — *Machilellus cariocus*, femina: 1. oculi et ocelli supra inspecti; 2. oculus et ocellus capite parum obliquo; 3. antennae articulus trigesimus quartus; 4. palpus maxillaris; 5. eiusdem articuli penultimus et ultimus magis ampliati; 6. palpus labialis; 7. pes paris tertii; 8. eiusdem tarsus et praetarsus magis ampliati; 9. urosternum $5^{um}$; 10. eiusdem stilus magis ampliatus; 11. stilus segmenti $9^{i}$.

## *Machilellus moderatus*, sp. n.

Fig. III

♂ Corpus brunneum antennis pedibusque concoloribus, palpis maxillaribus articulorum $2^{i}$, $3^{i}$ apice et $4^{i}$ basi obscuriore maculatis.

Oculi inter sese tractu oculi dimidiam latitudinem parum longiore tangentes; oculus singulus parum (C. 1/7) latior quam longior; ocelli laterales quam oculi latitudo fere 1/5 minus lati.

Antennae corporis longitudinem (sine cercis) subaequantes, 23-articulatae (forsan haud integrae), articulo primo fere duplo longiore quam latiore, flagello attenuato, articulo ultimo in articulinis 14 diviso, setis 1-2 transverse seriatis instructis; palpi maxillares sat attenuati, articulo secundo parte apicali dorsuali in processum unicinatum sat longum producta; palpi labiales articulo ultimo magno, introrsum multo producto, toto fere duplo ad apicem latiore quam longiore.

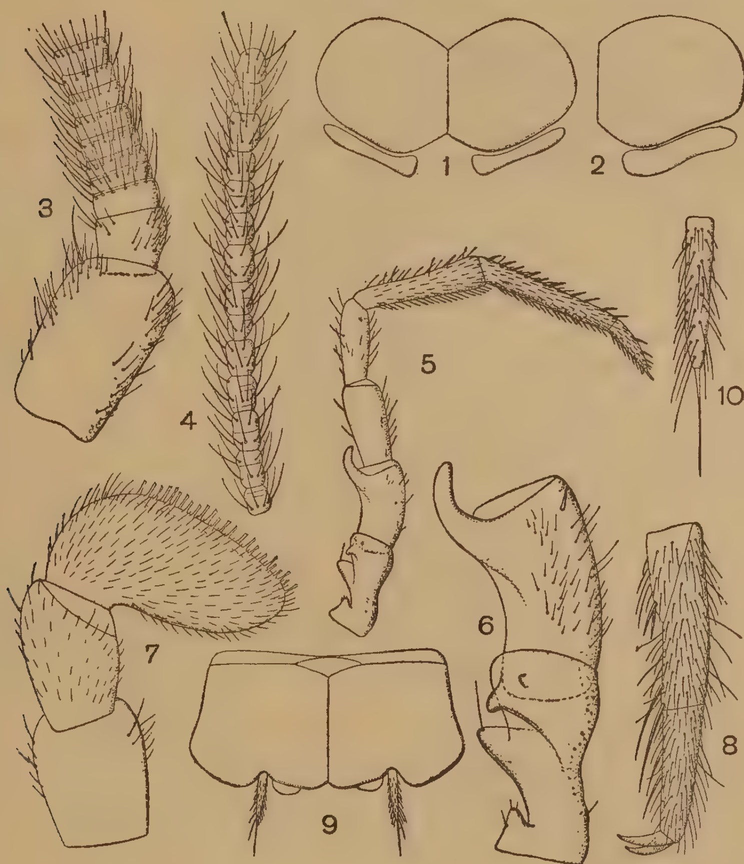



Fig. III — *Machilellus moderatus*, mas: 1. oculi et ocelli supra inspecti; 2. oculus et ocellus capite parum obliquo; 3. antennae pars proximalis; 4. antennae articulus vigesimus tertius; 5. palpus maxillaris; 6. eiusdem pars proximalis magis ampliata; 7. palpus labialis; 8. pedis paris tertii tarsus et praetarsus; 9. urosternum 5um; 10. eiusdem segmenti stilus magis ampliatus.

Thorax arcu dorsuali parvo, bene convexo; pedes primi paris femore quam cetororum aliquantum crassiore, setosi, tibia et tarso etiam setis paucis robustioribus et parum longioribus instructis.

Abdomen. Urosterna 2—7 parte mediana perparva subcoxis angulo postico laterali convexo, parum producto; stili segmenti 5i (cum seta apicali) c. 3/8 bre-

viores, setis sat numerosis et sat longis instructi, seta apicali quam stilus fere 1/4 breviore; stili segmenti 9i quam subcoxae eiusdem segmenti fere 1/5 breviores, setis numerosis instructi.

Penis brevissimus, simplex.

Cercus medianus in exemplo typico haud integer; cerci laterales facie interna setis nonnullis spiniformibus auctis.

Long. corporis mm. 7, lat. thoracis, 2; long. antennarum 7, palporum maxillarium 2,80, pedum paris tertii 3, cercorum lateralium 3.

Habitat. Exemplum typicum sub saxo in memore montis "Corcovado" apud Rio de Janeiro legi.

Observatio. Species haec a praecedente oculis praesertium minoribus distinguenda est.

———o———

# CONSIDERACIONES ACERCA DE LA DIFTERIA DEL RECIÉN NACIDO

POR

A. Sordelli

Director del Instituto Bacteriológico del D. N. H., Buenos Aires

Este asunto que ha sido ya tratado por pediatras Argentinos (ELIZALDE y colaboradores) fué objeto ultimamente de una reunion en que se expusieron distintos aspectos del problema (BERUTTI, CIBILS AGUIRRE, GARRAHAN, GALDI, SORDELLI) sin llegar a conclusiones definitivas. Quedó en cambio, en forma inequívoca a mi entender, en pié, el problema integral de la clínica y la patogenia de la afección que se conoce como "la difteria del recién nacido". De ella y en términos generales trataré a continuación ocupándome preferentemente de lo esencial de su patogenia, replanteando el problema cuyo estudio iniciado en el invierno de 1939 se prosigue actualmente.

La difteria está definida por un cuadro clínico, lesiones anatómicas que le son propias y un agente etiológico. La ausencia de cualquiera de estos tres elementos definidores, y con más razón, la ausencia de dos, impone reservas o la negación de la existencia de la enfermedad. La ausencia del agente etiologico (*C. diphteriae*) obliga a negar la naturaleza diftérica del proceso; la falta de un cuadro clínico conocido como diftérico impide dar a la enfermedad el nombre de difteria, hasta agotar la investigación por el empleo de los recursos de la clínica y de las patologías.

La suma de conocimientos que permite ser afirmativo en el caso de la difteria clásica es tal, que dificilmente pueden invocarse argumentos que obliguen a modificar el concepto actual afianzado en la clínica, la anatomia patológica y la etiologia.

La difteria del recién nacido escapa en cambio de este orden creado por más de un siglo de investigación. Enfermedad de hallazgo frecuente en los servicios donde se encuentran reunidos los recién nacidos, sus caracteristicas clínicas no corresponden a las de la difteria clásica.

En general se reduce al coriza diftérico y solo ocasionalmente adquiere la forma seudomembranosa, caso que cabe perfectamente en la difteria clásica. Al decir, en general se reduce al coriza diftérico, no hago sino reproducir la opinion más corrientemente sustentada en la Argentina y otros paises, sin que ello signifique que es unánime tal idea. En efecto, si la opinion de MARFAN coincide en aceptar la fre-

cuente existencia del coriza difterico, se aparta de la unanimidad al atribuir a la afección diftérica del lactante un cuadro polimorfo por la propagación de la afección a otros organos o aparatos y por asignarle gravedad extrema a la enfermedad. Esta opinión de MARFAN se completa con la ausencia de las caracteristicas que son propias de la patologia de la difteria clásica.

Sea cual fuese la posición que se adopte, existe unanimidad en aceptar que la difteria del recién nacido difiere por la clínica y la patología de la difteria clásica.

Con el objeto de examinar más facilmente el asunto, expongo a continuación los hechos que constituyen el conocimiento actual de la materia que nos interesa.

A

1.°) La difteria del recién nacido (difteria del lactante) difiere de la clásica por su clínica y su patologia.

2.°) La enfermedad se observa desde el nacimiento hasta el 6.° mes de vida y rara vez después de esta edad.

3.°) El número de enfermos con esta forma de difteria es a veces muy grande y alcanza el caracter de pequeñas epidemias, sobre todo entre los lactantes reunidos en servicios clínicos o de maternidad.

4.°) Las estadisticas de mortalidad solo consignan cifras insignificantes para las muertes por difteria ocurridas en el primer año de vida.

En este grupo de hechos aparece la difteria del recién nacido ya como una enfermedad muy benigna, ya como una enfermedad con letalidad elevada como dice MARFAN, pero tan atípica que las muertes no son atribuidas al *C. diphteriae.*

B

1.°) El niño recién nacido tiene con gran frecuencia una inmunidad antitoxica pasiva a la difteria por transmision placentaria y por absorción de la antitoxina de la leche. La frecuencia de inmunidad antitóxica depende de la frecuencia de la inmunidad materna: al nacer varía del 85 al 93% y se reduce al 40% a los seis meses de edad.

2.°) Los niños recién nacidos, hasta despues de los seis meses de edad, no son susceptibles de inmunización contra la difteria, por el mecanismo antitoxico.

C

1.°) La bacteria de Loffler, agente de la difteria, no es una especie absolutamente uniforme y existen variedades que se distinguen por caracteres menores y que determinan generalmente formas clínicas diferentes.

2.º) La mucosa nasal del recién nacido tiene menor sensibilidad a la toxina y a la agresión de la bacteria de Loffler; las amígdalas del recién nacido tienen constitución diferente de las del niño de los 6 meses. (Estas dos afirmaciones no tienen validez definitiva y así figuran en la literatura).

*

* *

Esta enunciación de hechos es suficiente para hacer las consideraciones sobre la difteria del recién nacido tal como nos lo hemos propuesto y lo dice el título de esta pequeña nota.

I) La primera reflexión aparece al considerar la edad en que la frecuencia de la difteria del recién nacido es mayor, que es precisamente aquella en que el número de inmunes es más grande.

Como esta inmunidad es antitoxica, pueden conciliarse los dos hechos suponiendo que la agresión por la bacteria se efectua por un mecanismo distinto del de la intoxicación diftérica y que el niño recién nacido carece de inmunidad para esa agresión, o tiene una sensibilidad particular.

Esta hipótesis permite explicar además todo el cuadro: La falta de inmunidad y la sensibilidad particular y efímera, del recién nacido a un cierto factor de agresión de la bacteria de Loffler, hacen posible la difteria del recién nacido, la que por otra parte no puede tener la fisonomia de la difteria clásica por cuanto el niño tiene inmunidad antitóxica y deben por lo tanto estar ausentes los fenómenos de intoxicación.

Pero si aceptamos lo dicho anteriormente hemos creado una nueva entidad clínica por la existencia de una nueva patogenia. ¿Y acaso no es esto precisamente lo que ocurre y afirma la coincidente opinion de todos los clínicos que reconocen a la difteria del recién nacido como una entidad clínica distinta de la clásica?

Por el momento, la hipótesis no tiene otros fundamentos que los derivados de la clínica y la patologia de la difteria del recién nacido pero no contradice ningún hecho conocido.

II) En el segundo grupo de hechos mencionados (B) figura el de la reacción de Schnick, obligan a considerar esta afirmación de más grado y frecuencia que la de la madre.

Pues bien, el examen de las cifras de frecuencia de inmunidad y de la reacción de Schick, obligan a considerar esta afirmación de más cerca, no para contradecirla, sino para averiguar si no existe algun otro hecho concomitante al de la inmunidad pasiva antitoxica que explique la disociación de las cifras.

Relacion entre el numero de niños Schick +
y el contenido de antitoxina de la sangre

| Edad | Sin Antitoxina % | Schick Positivos % |
|---|---|---|
| 0 | 16 | 4.9 |
| 3 m. | 29 | 28 |
| 6 m. | 44 | 43 |
| 9 m. | 60 | 59 |
| 12 m. | 68 | 70 |
| 2 a. | 69 | 72 |
| 3 a. | 72 | 74 |
| 4 a. | 52 | 53 |
| 5 a. | 56 | 66 |
| 6 a. | 56 | 63 |
| 7 a. | 63 | 72 |

El cuadro que antecede tomado del tratado de Difteria del Medical Research Council (H M S O 1923, Londres) revela el hecho interesante de la disociación de las cifras de las columnas sin antitoxina y Schick positivos; antes de los 9 meses de edad los niños parecen ser menos sensibles a la toxina que lo indicado por la frecuencia de la inmunidad antitóxica, por arriba de los 5 años sucede el fenómeno inverso, que por el momento no nos interesa.

Como el hecho tiene suma importancia para el asunto que tratamos obtuve por la colaboración de los Dres. Galdi, Manzullo y Orellana las cifras que van a continuación y cuyo examen revela el hecho importante de la disociación entre la reacción de Schick y el contenido de antitoxina de la sangre.

| N.º de casos | Edad hijo | R. de Schick | | Dosaje de antitoxina | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Madre | Hijo | Madre | Hijo |
| 14 | 7 d. | Negt. | Negt. | 1/100 | (a) |
| 8 | 11 d. | Post. | Negt. | 1/300 | 1/500 o menos |
| 4 | 19 d. | Negt. | Negt. | 1/10 | 1/500 o menos |
| 2 | 21 d. | Post. | Negt. | 1/300 o menos | (b) |
| 6 | 30 d. | Negt. | Negt. | 1/10 | 1/100 |
| 13 | 32 d. | Post. | Negt. | 1/100 | 1/300 |
| 12 | 33 d. | Negt. | Negt. | 1/10 | 1/300 |
| 1 | 36 d. | Post. | Post. | 1/300 o menos | 1/300 o menos |
| 9 | 37 d. | Negt. | Negt. | 1/10 | 1/500 o menos |
| 3 | 46 d. | Post. | Negt. | 1/300 o menos | (c) |
| 7 | 47 d. | Negt. | Negt. | 1/30 | 1/500 o menos |
| 5 | 120 d. | Post. | Post. | 1/500 o menos | (d) |
| 11 | 120 d. | Negt. | Negt. | 1/10 | 1/500 o menos |

(a) Seguramente menos de 1/100 U.A. y por tanto en la zona donde la reacción de Schick debe ser positiva.

(b) Seguramente menos de 1/300 U.A. y por tanto en la zona donde la reacción de Schick debe ser positiva.

(c) Idem.

(d) Seguramente menos de 1/500 U.A. y por tanto en la zona de reacción de Schick positiva.

Las reacciones de Schick debieron ser positivas en 11 niños de los 13 examinados y solo se obtuvieron 2, en los casos 1 y 5.

Este hecho corresponde cualitativamente con lo expuesto en el cuadro anterior, pero la disociación es mucho más grande. (13 sin antitoxina y solo 2 Schick positivas).

Además hay un hecho que contradice lo que la literatura acepta, cual es la diferencia del contenido de antitoxina en la sangre materna y la sangre del hijo, como sucede en el caso 4, 1/10 y 1/500 de U A respectivamente; en el caso 6, 1/10 y 1/100; en el caso 13, 1/100 y 1/300; en el caso 12, 1/10 y 1/300; en el caso 9, 1/10 y 1/500; en el caso 7, 1/30 y 1/500 y en el 11, 1/10 y 1/500 de U A. Nada podemos decir de este sorprendente hallazgo, sino que nuevas y más numerosas cífras nos permitiran establecer su alcance.

Podemos decir que si se trata de una serie solo aparentemente anomala, por el pequeño número de exámenes, hemos sido afortunados, pués ha permitido encontrar reunidos un número crecido de lactantes sin antitoxina en los que la piel se ha mostrado insensible a la toxina diftérica.

Es necesario agregar como dato importante que los niños estudiados padecian de coriza diftérico típico, de modo que la contradicción con lo establecido en la literatura es solo parcial, pués esta se refiere a niños que no padecen de esa enfermedad en el momento del examen. Un hecho sin embargo queda establecido y es que la sensibilidad de la piel del recién nacido a la toxina diftérica es generalmente nula cuando se la investiga por el método de Schick y que por tanto las reacciones de Schick negativas en los recién nacidos no deben ser atribuidos necesariamente a la presencia de antitoxina circulante.

Nada más simples y natural que considerar ahora la difteria del recién nacido con el auxilio de la hipótesis mencionada un poco más arriba y de este hallazgo de la falta de sensibilidad de la piel a la toxina diftérica aun en ausencia de antitoxina en la sangre [1] y además de la consecuencia inmediata que permite afirmar que en la difteria del recién nacido no aparecen signos de intoxicación diftérica aún en niños sin antitoxina circulante y cuya piel no reacciona a la toxina diftérica.

La hipótesis de la existencia de una sensibilidad especifica efímera o de la falta de inmunidad a un factor de agresión de la bacteria

---

(1) La expresión ausencia no es exacta, y lo correcto sería decir: aun en presencia de una cantidad de antitoxina inferior a la mayor que se requiere para que la piel reaccione en la prueba de Schick.

de Loffler como causa de la difteria del recién nacido y la falta de intoxicación por que existe la antitoxina circulante, debe modificarse en esta parte diciendo que la difteria del recién nacido obedece a una patogenia particular que dos elementos esenciales caracterizan. 1) El recién nacido no es sensible a la toxina difterica. 2) El *C. diphteriae* tiene un factor de agresión para el recién nacido distinto de la toxina, sea por falta de inmunidad del sujeto o por una sensibilidad especifica efímera.

¿ Existe algún hecho que apoye esta hipótesis?

III) Ya al emitirla se tuvo en cuenta la falta de lesión toxica de la piel por la toxina y además existe el hecho conocido de la ausencia de lesiones diftéricas toxicas en los niños recién nacidos que padecen la enfermedad. Esto justifica por el momento la extensión del hallazgo de la insensibilidad cutánea, a otros organos o a todo el organismo.

En la enumeración de los hechos conocidos hemos referido que los niños de menos de seis meses de edad no son susceptibles de inmunización antitoxica. Este fenómeno implica, de acuerdo con los conocimientos actuales, una falta de afinidad del antígeno por las células o una insensibilidad de estas a la acción del antigeno.

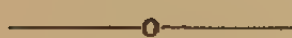
Estos son los hechos que sirven por el momento de base de la supuesta falta de sensibilidad del recién nacido a la toxina diftérica.

Si es valida la suposición de la insensibilidad de recién nacido a la toxina, es necesario invocar otro agente de agresión distinto de la toxina, pues la sensibilidad del recién nacido a la infección por el *C. diphteriae* es muy grande, como lo prueba la experiencia de los servicios donde se encuentran reunidos los recién nacidos.

Además conviene tener presente el apartado segundo del grupo C de la enumeración de nuestros conocimientos, pues tambien esa "hipótesis", satisface por lo menos parcialmente las exigencias del problema. Le doy el nombre de hipótesis por cuanto la demonstración definitiva no se ha dado. Es verosimil tambien, que de ser cierta la supuesta insensibilidad a la toxina, las mucosas nasal y faringea participen de la propiedad general, con lo cual existiria además de la insensibilidad del organismo a la intoxicación diftérica, una reducida o mala absorción de la toxina que produce el *C. diphteriae* en las lesiones nasales.

## CONCLUSION

Al exponer la hipótesis de la particular patogenia de la difteria del recién nacido, hemos contado con los hechos de la clínica y de la inmunidad y el hallazgo de la falta de sensibilidad cutanea a la toxina diftérica de los recién nacidos sin antitoxina circulante. No se me oculta que entre esta hipótesis y la afirmación definitiva, que la enfermedad producida en el recién nacido por el *C. diphteriae* es una entidad mórbida distinta de la difteria, media un gran trecho por recorrer, pero he juzgado más conveniente para el progreso del conocimiento de este problema exponer ya la hipótesis, para que clínicos y patólogos al considerarla agreguen las observaciones que conducirán al esclarecimiento de la verdadera patogenia de la difteria del recién nacido.



# NOTAS SOBRE A BIOLOGIA DO "CHRYSOMPHALUS AONIDUM (L., 1758)" (HOMOPTERA) NO ESTADO DE S. PAULO - BRASIL

POR

A. A. de Toledo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 96-97

## INTRODUÇÃO

Por se tratar de uma espécie cosmopolita, que ocupa lugar destacado entre os coccideos prejudiciais à citricultura em certos países, tal como acontece nas regiões citricolas do Egito, Palestina, etc., vários trabalhos têm sido publicados sobre a sua biologia, destacando-se entre eles os do Prof. H. PRISNER (4); A. BALACHOWSKY (1); C. CHWEIG & A. GRUNBERG (2).

Segundo êsses autores, os danos causados por essa espécie aos pomares de citrus são de ordem tal, que sem as medidas controladoras adotadas, a citricultura daquelas regiões estaria fadada ao desaparecimento.

Tratando-se de uma praga, cuja difusão não respeitou fronteiras e sendo o nosso país tão vasto e dotado de climas tão diversos, que satisfazem perfeitamente as exigências de todas, ou quasi todas as plantas cultivadas na atualidade, seria demasiado pretender que os nossos pomares, pelo menos em algumas regiões, não tivessem também sido invadidos pela praga.

Segundo COSTA LIMA (3), a espécie ocorre em quasi todo o Brasil, atacando plantas de várias famílias. PRISNER (4) menciona 99 espécies hospedeiras.

A praga é portanto polífaga, onde quer que exista, tendo, porém, notavel predileção pelas plantas do gênero Citrus.

Talvez, devido a um fenômeno de natureza puramente ecológica, a praga não se tenha mostrado muito prejudicial à citricultura paulista; todavia este fato, por si só, não constitue motivo bastante para que ela seja relegada ao plano dos insetos inocuos.

Na região de Campinas e seus arredores, onde foram feitas as observações constantes deste trabalho, os efeitos da praga sôbre as plantas novas de citrus são às vezes suficientemente fortes para causar a queda das folhas e retardar-lhes visivelmente o desenvolvimento. Os casos de ataque ás plantas em idade de frutificação são menos comuns,

mas ocorrem, havendo casos de densa população recobrindo tanto as folhas como os frutos verdes ou verdolengos, provocando nestes uma degenerecência clorofiliana.

Este trabalho, de carater puramente comparativo, foi iniciado em 1937 e prolongou-se até 1939. Durante êsses dois anos de pesquisas, a determinação dos pontos vulneraveis da espécie foi sempre o alvo visado.

À Diretoria do Instituto Agronômico, pela autorização concedida para coleta de material na sua Estação Experimental, ao Dr. Henrique F. G. Sauer pelas valiosas sugestões e crítica deste trabalho, e ao Snr. José Custodio, pela assistência no decurso do trabalho, o autor expressa os seus agradecimentos.

## PLANO DE TRABALHO E TÉCNICAS EMPREGADAS

Tratando-se de uma espécie cuja reprodução não sofre solução de continuidade, a sucessão e imbricação das gerações impossibilitam observações seguras quanto ás fases evolutivas, longevidade, etc., sôbre as plantas infestadas normalmente.

Plantou-se então um lote de laranjeira, do qual, depois de um ano de vegetação, a partir de Abril de 1937, mensalmente se infestou uma série de dez plantas, afim de se observar isoladamente o ciclo do coccideo, a partir de cada mês dos dois anos de pesquisas.

A infestação foi sempre feita alfinetando-se folhas infestadas nas folhas das plantas indenes, pela manhã, e retirando-as à tarde. Além da facilidade, este processo oferece ainda a vantagem de se aproveitarem sòmente larvas presumivelmente da mesma idade.

Os estádios e sua duração foram determinados pelo exame diario de algumas escamas em cada série de plantas infestadas.

Havendo em cada estádio duas fases distintas, de duração variavel: período ativo e período de muda, essas fases foram observadas isoladamente.

Para a determinação do estádio em que se dá a fecundação, pesquisas sôbre a partenogênese e determinação da capacidade ovipositora da espécie, adotaram-se células de celulóide.

Essas células, de construção facilima, constam de uma lâmina de celulóide transparente colada a uma corôa ou arruela de feltro (fig. *A*, estampa 96) cujo diâmetro interno seja aproximadamente de um centímetro. Com esse dispositivo preso ás folhas da planta, por dois ou mais "clips", foi sempre possível observar-se o inseto em conjunto ou isoladamente, a partir de qualquer estádio. O feltro, adaptando-se bem à superficie da folha, véda a entrada ou saída, enquanto o celulóide, por transparência, deixa passar a luz indispensável.

## ADULTO

O *Chrysomphalus aonidum* adulto, visto em conjunto na superfície das folhas da planta hospedeira, mormente quando a população é densa, ilude o observador quanto á coloração real de sua escama,

porque aí ele se apresenta com uma tonalidade puxada a preta, o que justifica a denominação vulgar de "Black scale" usada pelos autores inglêses.

A escama da fêmea é de côr violácea escura e formato mais ou menos circular, encerrando na parte central um núcleo de côr laranja avermelhada, constituido pelas exuvias. Observada ao microscópio a escama apresenta duas zonas distintas: a central, correspondente às secreções havidas durante o primeiro e segundo estádios e respectivas exuvias, limitada pela corôa externa, de côr escura com margem clara.

O diâmetro da escama varia entre (1,m7) um milímetro e sete decímos a 2 milímetros. O núcleo central varia de 540 a 600 micra de diâmetro.

A escama do macho é menor, alongada e de coloração mais clara do que a da fêmea. Também nela se nota o núcleo alaranjado, correspondente a secreção e exuvia do primeiro estádio.

O seu comprimento varia de 840 a 860 micra, por 600 a 640 de diâmetro. O diâmetro do núcleo oscila entre 270 a 300 micra.

## LONGEVIDADE

O ciclo vital da espécie é sempre uma resultante das condições de cada estação. Poder-se-ia mesmo dizer que, até certo ponto, a longevidade varia inversamente ás médias termométricas (tabela 1).

Ao que parece o inseto requer, para completar o seu ciclo, um armazenamento de calor facilmente conseguido na estação quente, ao passo que, na estação fria, período quasi três vêzes maior se faz necessário para que haja tal armazenamento.

TABELA 1

Longevidade das fêmeas do *Chrysomphalus aonidum* L. partindo de 13 meses consecutivos

Campinas

| Series | Data da fixação | Data da morte | Duração (dias) | Temp. C. |
|---|---|---|---|---|
| A | 2- 4-37 | 10-10-37 | 191 | 20 |
| B | 5- 5-37 | 5-11-37 | 184 | 20 |
| C | 9- 6-37 | 16-11-37 | 160 | 20,6 |
| D | 2- 7-37 | 26-11-37 | 147 | 20,8 |
| E | 6- 8-37 | 10-12-37 | 126 | 21,5 |
| F | 3- 9-37 | 4- 1-38 | 122 | 22,3 |
| G | 6-10-37 | 22- 1-38 | 108 | 22,6 |
| H | 8-11-37 | 10- 2-38 | 95 | 23,8 |
| I | 6-12-37 | 8- 3-38 | 83 | 24,0 |
| J | 7- 1-38 | 30- 4-38 | 114 | 23,6 |
| K | 1- 2-38 | 20- 7-38 | 170 | 21,3 |
| L | 8- 3-38 | 10- 9-38 | 185 | 20,1 |
| M | 9- 4-38 | 30-10-38 | 204 | 19,2 |

Na série de plantas *I*, por exemplo, cuja infestação foi feita em Dezembro, o ciclo total do inseto foi de 83 dias, para os quais vigorou uma temperatura média diária de 24°C., ao passo que, para as séries *A* e *M*, nas quais a evolução do inseto abrangeu o inverno sob uma média diária de 20 e 19°,2 C. respectivamente, a duração vital foi de 191 dias na série *A* e de 204 na série *M*.

Multiplicando-se os números de dias de vida do inseto pela temperatura média correspondente, teremos: no primeiro caso, série *I*, $83 \times 24^{\circ} = 1992^{\circ}$C.; para o segundo caso, série *M*, $204 \times 19^{\circ},2 = 3916^{\circ},8$ C.

Entrando-se com estes produtos na equação de BLUNCK (2) *(Blunck's equation of the threshold of development)* $C = \frac{ATA - BTB}{A - B}$, achamos facilmente a temperatura constante, que em ambos os casos obrigaria o inseto a uma diapausa.

$C = \frac{3916^{\circ},8 - 1992^{\circ}}{204 - 83} = 15^{\circ},9$C. As diferenças entre a constante 15°,9C. e as temperaturas médias diárias, representam os índices do armazenamento diário de calor, o qual é na série *I*, de $24^{\circ} - 15^{\circ},9 = 8^{\circ},1$C. e na série *M*, $19^{\circ},2 - 15^{\circ},9 = 3^{\circ},3$C.

Como no primeiro caso o ciclo vital foi de 83 dias, logo o armazenamento total, si assim nos pudermos expressar, foi de: $83 \times 8^{\circ},1 = 672^{\circ},3$C. Procedendo-se igualmente com os dados da série *M* teremos: $204 \times 3^{\circ},3 = 673^{\circ},2$C.

Poderiamos, si os fatos biológicos a rigor comportassem a exatidão matemática, estabelecer a seguinte igualdade:

$$83 \times 8^{\circ},1 = 204 \times 3^{\circ},3$$
$$672^{\circ},3 = 673^{\circ},2$$

Em suma a longevidade da espécie é sempre menor quando o ciclo vital coincide com a estação quente.

Também foi observado que as fêmeas não fecundadas podem viver até nove mêses, o que constitue um recorde na longevidade da espécie.

## REPRODUÇÃO

### COPULA E PARTENOGÊNESE

A fecundação dá-se normalmente depois da segunda muda das fêmeas, isto é, durante o terceiro estádio. O início deste estádio coincide com a emergência dos machos de uma mesma prole.

Em todas as séries de plantas infestadas mensalmente, algumas larvas foram isoladas por meio da célula de feltro e celulóide. Umas antes da primeira muda, outras depois e finalmente outras tantas depois da segunda muda, isto é, no terceiro estádio.

Logo que se tornou possível a distinção dos sexos, fez-se a eliminação dos machos da metade de cada série de larvas isoladas, reservando-se a outra metade com os dois sexos para servir de testemunha com relação ao ambiente estabelecido pela célula.

Nas testemunhas, sem exceção, todas as larvas evoluiram e procrearam; ambientes favoravel, portanto.

Das isoladas sem o macho durante o terceiro estádio, também todas procrearam; das isoladas no período compreendido entre a primeira e segunda muda, rarissimas procrearam; da série isolada antes da primeira muda nenhuma procreou. Desse fato pode-se concluir: 1.º) que durante os 13 mêses em que estas observações foram feitas não houve reprodução por partenogênese; 2.º) que, embora raramente, a fecundação pode dar-se durante o segundo estádio; 3.º) que a fecundação se dá normalmente durante o terceiro estádio, isto é, durante o período de preoviposição.

A fecundação se efetua a plena luz do dia e não a noite, segundo suposição de alguns autores, e pode ser facilmente observada no interior das células de celulóide, logo que surjam os primeiros machos de uma prole qualquer, criada em tais condições.

Não havendo interferência de algum fator que possa perturbar a evolução normal do coccideo, como, por exemplo, parasitas, a proporção dos sexos é geralmente de um macho por fêmea; e como um macho pode fecundar até 12 fêmeas, não ha hipótese de uma fêmea deixar de procrear por falta do concurso masculino.

## OVO

O ovo é de côr amarela pálida, geralmente coberto por finissima camada cerosa de côr esbranquiçada.

Suas dimensões, segundo Balachowsky, Chweig & Grunberg, são: comprimento 225 a 250 micra, diâmetro 125 a 150 micra. Essas dimensões são consideradas duvidosas por Prisner. Este autor dá como resultado das medidas por êle efetuadas um comprimento de 190 a 213 micra por 101 a 109 de diâmetro. As dimensões por nós constatadas numa série de ovos, oscilaram entre 180 a 216 micra de comprimento, por 100 a 124 de diâmetro.

## PERÍODO DE PREOVIPOSIÇÃO

Esta fase, para cujo início foi tomado como referência o fim da segunda muda do inseto, variou sensivelmente, porém sempre em relação com a temperatura. Pela tabela 2 vê-se que a duração deste período subiu de um mínimo de 23 dias para a série *I*, a um máximo de 70, para a série *M*. E' também neste período que o inseto, depois de fecundado, completa a elaboração do seu escudo e adquire os caracteristicos morfológicos definitivos da forma adulta.

Quando a espécie é forçada a uma hibernação, esta geralmente se processa neste estádio. A grande quantidade de insetos adultos que permanece neste estádio sem iniciar a postura, ás vêzes até 70 dias, como acontece a todos aqueles cujo ciclo vital comece nos mêses de Março e Abril de cada ano, e cujo período de preoviposição coincida com os mêses de Junho e Julho, confirma plenamente este fato.

TABELA 2

Períodos de preoviposição e oviposição do *Chrysomphalus aonidum* L.
Campinas

| Séries | Preoviposição | | | Oviposição | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Inicio | Duração em dias | Temp. º C. | Inicio | Duração em dias | Temp. º C. |
| A | 7- 6-37 | 62 | 19 | 8- 8-37 | 63 | 22, |
| B | 20- 7-37 | 58 | 21 | 16- 9-37 | 50 | 23, |
| C | 17- 8-37 | 36 | 22,6 | 22- 9-37 | 55 | 23,3 |
| D | 3- 9-37 | 37 | 22,7 | 10-10-37 | 47 | 23,2 |
| E | 27- 9-37 | 38 | 22,5 | 5-11-37 | 35 | 24,2 |
| F | 19-10-37 | 31 | 23,0 | 20-11-37 | 45 | 23,9 |
| G | 18-11-37 | 32 | 22,7 | 20-12-37 | 33 | 24,5 |
| H | 13-12-37 | 31 | 23,2 | 13- 1-38 | 28 | 25,0 |
| I | 10- 1-38 | 23 | 25,1 | 2- 2-38 | 35 | 23,9 |
| J | 4- 2-38 | 27 | 25,0 | 2- 3-38 | 59 | 22,7 |
| K | 7- 3-38 | 28 | 24,3 | 4- 4-38 | 107 | 17,7 |
| L | 13- 4-38 | 51 | 19,2 | 3- 6-38 | 99 | 18,5 |
| M | 1- 6-38 | 70 | 17,2 | 10- 8-38 | 81 | 20,1 |

Pela análise da tabela 2, constata-se facilmente que os maiores períodos de preoviposição correspondem exatamente às mais baixas médias termométricas (Séries *A* e *M*).

Com a melhoria das condições, a qual geralmente se verifica em Agosto, tem início a oviposição, que marca por sua vez um novo recrudecimento de infestação.

## OVIPOSIÇÃO

De todas as fases biológicas do *Chrysomphalus aonidum*, é esta, talvez, a que maiores dificuldades oferece a uma perfeita observação, dada a impossibilidade da contagem dos ovos sem perturbar a vida normal da fêmea.

PRISNER, no Egíto, estimou a postura pela contagem dos corions encontrados sob a escama de fêmeas que já haviam encerrado o seu período de atividade genital, e chegou a conclusões que, comparadas com os resultados das observações de CHWEIG & GRUNBERG (2) no seu trabalho (The problem of Black Scale in Palestine), estão longe da realidade. Estes autores não fazem menção da técnica que adotaram, porém citam posturas máximas de 211 a 247 e média de 150 ovos por fêmea, enquanto PRISNER, pelo seu processo, não constatou postura

superior a 80 unidades por fêmea, embora suas observações tivessem sido feitas numa região (Egito) cujas condições climatéricas são mais ou menos idênticas ás da Palestina.

Não sendo possível técnica que conduza a resultados reais quanto á capacidade ovipositora do coccideo, o autor preferiu avalia-la pela contagem das larvas componentes da prole de cada fêmea, cujo número representará forçosamente, com grande aproximação, o número dos ovos de que provieram.

Tal processo só se tornaria inadequado si os ovos estivessem sujeitos ao fenômeno de poliembrionismo; não sendo este, porém, o caso, a avaliação da postura pela contagem das larvas é, sem dúvida, a mais racional e viavel, pelo emprêgo das células de celulóide.

Aplicada sôbre a folha da planta (fig. *B*, estampa 96) de modo a encerrar o inseto, e aí presa por dois ou mais "clips", a célula de feltro e celulóide revelou-se plenamente satisfatória, pelo fato de forçar as larvas a se fixarem em área restrita e facilitar a sua contagem.

Por observações diárias atravez do celulóide, foram facilmente determinados tanto o início como o fim da postura.

1.º) — pela presença ou ausência de larvas não fixadas;

2.º) — pela emergência dos primeiros machos integrantes da prole. (A aparição destes é o indício certo de que a progenitora está nos seus últimos dias de vida);

3.º) — pelo exame das escamas contemporâneas não protegidas, existentes sôbre a mesma planta.

Ainda pela análise dos dados da tabela 2, conclue-se que de todas as fases do ciclo vital da espécie é, sem dúvida, o período de oviposição o mais sensivel aos efeitos do fator temperatura, relativamente à sua duração, como se infere do confronto dos diferentes períodos registrados para as 13 séries de plantas que se prestaram às observações. Este período, na série *H*, por exemplo, foi de 28 dias, enquanto um período de 107 dias foi constatado para a série *K*.

## CAPACIDADE OVIPOSITORA

Não tendo sido possível uma observação verdadeiramente segura quanto á oviposição, mas sim quanto ao número de larvas, seria portanto mais razoável que se tratasse, nesta parte, mais da progénie do que propriamente da capacidade ovipositora da espécie.

Os dados mencionados na tabela 3 são suficientemente significativos e mostram claramente quão alto é o índice de multiplicação da praga nesta região do Estado de São Paulo. A produção média individual é incomparavelmente superior a todos os resultados citados para as regiões de outros países, onde a praga tem sido estudada. Si não houvesse fatores controladores naturais (que serão abordados oportunamente), esta espécie, por si só, constituiria sério obstaculo à citricultura paulista, desde que se considere a grandeza dos algarismos da tabela 3.

A postura diária média por indivíduo é outro índice da proliferação da praga.

Determinados os períodos de oviposição e os números médios de larvas obtidas por série de plantas infestadas, facil foi, por simples operação aritmética, o calculo da produção média diária por indivíduo.

TABELA 3

Capacidade ovipositora do *C. aonidum* L.

| Séries | Temp. °C | Duração (dias) | Max. | Min. | Média | Média diaria por fêmea |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 22 | 63 | 263 | 96 | 165,2 | 2,62 |
| B | 23 | 50 | 231 | 91 | 157,0 | 3,14 |
| C | 23,3 | 55 | 236 | 60 | 110,7 | 2,01 |
| D | 23,2 | 47 | 235 | 130 | 186,0 | 3,95 |
| E | 24,2 | 35 | 251 | 87 | 198,2 | 5,66 |
| F | 23,9 | 45 | 285 | 217 | 245,0 | 5,44 |
| G | 24,5 | 33 | 211 | 100 | 172,6 | 5,23 |
| H | 25,0 | 28 | 280 | 80 | 171,0 | 6,10 |
| I | 23,9 | 35 | 197 | 105 | 152,5 | 4,35 |
| J | 22,7 | 59 | 170 | 49 | 128,3 | 2,16 |
| K | 17,7 | 107 | 165 | 72 | 134,0 | 1,25 |
| L | 18,5 | 99 | 141 | 60 | 97,0 | 0,99 |
| M | 20,1 | 81 | 230 | 90 | 175,0 | 2,16 |

A tabela 3 mostra que as fêmeas capazes de maior postura diária foram justamente as observadas sôbre as séries *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, cujos ciclos evolutivos se deram, a partir, respectivamente, dos mêses de Agosto, Setembro, Outubro, Novembro e Dezembro de 1937.

Balachowsky admite uma postura diária de 2 a 5 ovos por fêmea; Prisner, 2 a 3; porém nenhum deles se refere ás condições da época das observações.

Os resultados por nós constatados em épocas diversas oscilaram entre 0,99 e 6,10 ovos por dia e por fêmea.

Quando a praga é favorecida pelas condições climatéricas, a postura diária é grande e o período total de postura, pequeno; caso contrário, prolongada, com baixa média diária.

## INCUBAÇÃO

Observações efetuadas sôbre cerca de 400 ovos, de Agosto a Novembro de 1937, fazem crêr que o fator temperatura não tem, sôbre o tempo de incubação, a influência que evidentemente se esperava. Em qualquer dos mêses citados houve sempre ovos que eclodiram uma hora após a postura, assim como outros, cujo tempo de incubação foi de 24 horas. Tão grande discrepância nos períodos de incubação só é

explicavel pela discrepância também existente no grau de maturidade dos ovos: ao serem postos, a maturidade está as vêzes tão adiantada, que em certos casos a espécie faz lembrar a categoria dos coccideos ovovivíparos.

Quando as fêmeas são desprovidas da sua escama protetora, geralmente os ovos são postos ligados entre si à guiza de rosário, permitindo, portanto, perfeita observação da ordem de seu nascimento. Em tais condições, a eclosão deveria dar-se obedecendo á ordem do nascimento; porém são frequentes os casos de serem os primeiros nascidos os últimos a eclodir.

Pelos motivos expostos conclue-se que não pequenas são as dificuldades para que se possa organizar uma tabela demonstrativa da influência desempenhada pelo fator temperatura na maior ou menor duração da incubação. A tabela 4 refere-se apenas às porcentagens de ovos eclodidos em períodos horários. Todavia os seus dados permitem concluir que o período de incubação varia de uma a 24 horas para os mêses considerados.

TABELA 4

Porcentagens de ovos eclodidos em períodos horarios

| Tempo entre a postura e a eclosão. - Horas | Porcentagem eclodida | Tempo entre a postura e a eclosão. - Horas | Porcentagem Eclodida |
|---|---|---|---|
| 1 hora | 10,2 % | 6 horas | 3,4 % |
| 2 horas | 7,8 % | 7 » | 1,8 % |
| 3 » | 20,8 % | 8 » | 1,3 % |
| 4 » | 6,8 % | 19 » | 0,7 % |
| 5 » | 3,1 % | 20 a 24 » | 43,9 % |

E' interessante notar que os ovos cujo período de incubação foi além de 4 horas só eclodiram várias horas mais tarde, e entraram em sua maioria para a porcentagem que requereu o período máximo de 20 a 24 horas.

O maior número de ovos encontrado sob uma escama foi 12, e como o inseto estava em plena atividade genital, esses ovos forçosamente eram de idades diversas; todos êles eclodiram em tempo que variou de 1 a 17 horas.

Segundo BALACHOWSKY, a incubação varia de um a três dias; PRISNER admite um período de três a cinco dias.

LARVA

Fixação — Observações sôbre o tempo decorrido entre o nascimento e a fixação das larvas, em ambiente cuja temperatura oscilou entre 19°,5 C. e 24°,5 C., revelaram extremos que só as peculiaridades da espécie podem justificar.

O tempo mínimo verificado foi de 16 horas, e o máximo, de 31; a maioria, porém, fixou-se durante o período compreendido entre 16 e 24 horas depois do nascimento.

Contagem de larvas no campo — Esta contagem foi iniciada em Janeiro de 1937, e repetida bisemanalmente até Junho de 1939. O material

para todas as contagens foi sempre colhido na Fazenda Experimental do Instituto Agronômico, em Campinas, e examinado no mesmo dia da coleta, anotando-se a totalidade das larvas e ovos encontrados com 200 fêmeas adultas. Sendo curto o período de incubação dos ovos, praticamente a sua inclusão em nada pode alterar a exatidão dos resultados.

As médias mensais destas contagens, tabela 5, são suficientemente altas para de maneira bem clara revelarem a constante atividade genital da espécie.

TABELA 5

Número médio de larvas encontradas com 200 fêmeas adultas por mês, durante 1937, 1938 e 1939

Campinas

| Mêses | 1937 | 1938 | 1939 | Mêses | 1937 | 1938 | 1939 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Janeiro . . | 1.969 | 1.760 | 1.312 | Julho . . . | 290 | 1.029 | — |
| Fevereiro . . | 1.772 | 2.119 | 1.345 | Agosto . . | 807 | 2.494 | — |
| Março . . . | 1.378 | 1.718 | 1.396 | Setembro . . | 1.167 | 2.231 | — |
| Abril . . . | 1.514 | 1.568 | 1.143 | Outubro . . | 1.269 | 1.564 | — |
| Maio . . . | 1.190 | 1.788 | 1.448 | Novembro . | 2.216 | 1.535 | — |
| Junho . . . | 583 | 992 | 1.271 | Dezembro . | 1.883 | 842 | — |

Nas estações frias as médias sofreram uma redução relativa, aproximadamente de 50%, devido á grande porcentagem de fêmeas que, embora adultas, prolongaram o seu período de preoviposição geralmente até o mês de Agosto ou Setembro; porém outras, que iniciaram a oviposição em Maio e Junho, continuaram ovipondo, apezar das condições desfavoráveis. Este fato pode-se melhor constatar reportando-se á tabela 2.

As fêmeas cujo período de preoviposição teve inicio em Junho (Séries *A* e *M* tabela 2), só em Agosto, portanto dois mêses mais tarde, iniciaram a postura; por outro lado, aquelas cuja postura teve inicio entre Abril e Junho (Séries *K* e *L*), ovipuzeram durante 99 e 107 dias, correspondentes aos mêses mais frios do ano.

## EVOLUÇÃO LARVAL

### PRIMEIRO ESTÁDIO

Período ativo — Iniciado o primeio estádio a maioria das larvas abandona o abrigo da escama materna e procura, segundo o sexo e a estação em curso, a parte da planta hospedeira cujas condições melhor condigam com o seu hábito. Durante a estação fria ambos os sexos se fixam de preferência nas paginas mais insoladas das folhas, si bem que muitas larvas femininas se fixem sob a escama materna e fiquem assim duplamente protegidas durante o inverno. As larvas masculinas só excepcionalmente são encontradas em tais condições. No verão, porém, sómente as masculinas conservam esse fototropismo, enquanto as femininas revelam notável predileção pelas partes das folhas, galhos ou frutos menos expostos aos raios solares.

TABELA 6

Desenvolvimento das fêmeas do *C. aonidum* L. com a duração dos periodos ativos e de mudas dos diversos estádios em relação com a temperatura

Campinas

| Séries de Plantas infestadas | 1.º Estádio | | | | | | 2.º Estádio | | | | | | Adulto | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Período ativo | | | Período da 1.a muda | | | Período ativo | | | Período da 2.a muda | | | Periodo total de larva a adulto | |
| | Início | Duração em dias | Temp. ° C. | Início | Duração em dias | Temp. ° C. | Início | Duração em dias | Temp. ° C. | Início | Duração em dias | Temp. ° C. | Dias | ° C. |
| A | 2-4-37 | 9 | 22,5 | 11-4-37 | 17 | 17,6 | 28-4-37 | 12 | 21,5 | 10-5-37 | 28 | 16,5 | 66 | 19,3 |
| B | 5-5-37 | 19 | 19,6 | 24-6-37 | 21 | 17,1 | 14-6-37 | 21 | 18,9 | 5-7-37 | 15 | 21,8 | 76 | 18,8 |
| C | 9-6-37 | 25 | 18,5 | 4-7-37 | 15 | 19,1 | 19-7-37 | 13 | 19,8 | 2-8-37 | 15 | 21,5 | 68 | 18,5 |
| D | 2-7-37 | 19 | 19,4 | 21-7-37 | 14 | 20,2 | 4-8-37 | 12 | 21,3 | 16-8-37 | 18 | 20,5 | 63 | 18,6 |
| E | 6-8-37 | 12 | 21,5 | 18-8-37 | 14 | 19,5 | 1-9-37 | 14 | 20,5 | 15-9-37 | 12 | 23,9 | 52 | 21,7 |
| F | 3-9-37 | 14 | 21,2 | 17-9-37 | 7 | 24,7 | 24-9-37 | 12 | 21,2 | 6-10-37 | 13 | 23,0 | 46 | 22,7 |
| G | 6-10-37 | 12 | 21,7 | 18-10-37 | 11 | 21,4 | 29-10-37 | 11 | 23,3 | 9-11-37 | 9 | 24,0 | 43 | 23,1 |
| H | 8-11-37 | 8 | 22,9 | 16-11-37 | 13 | 21,9 | 29-11-37 | 5 | 28,2 | 3-12-37 | 10 | 23,2 | 36 | 23,8 |
| I | 6-12-37 | 7 | 23,3 | 13-12-37 | 10 | 22,2 | 23-12-37 | 12 | 22,8 | 4-1-38 | 6 | 23,9 | 35 | 23,9 |
| J | 7-1-38 | 8 | 25,4 | 15-1-38 | 6 | 24,0 | 21-1-38 | 7 | 25,9 | 28-1-38 | 7 | 25,1 | 28 | 25,1 |
| K | 1-2-38 | 9 | 25,0 | 10-2-38 | 8 | 23,5 | 18-2-38 | 5 | 23,1 | 23-2-38 | 13 | 23,9 | 35 | 23,7 |
| L | 8-3-38 | 10 | 23,4 | 18-3-38 | 5 | 24,5 | 23-3-38 | 7 | 23,7 | 30-3-38 | 13 | 22,8 | 35 | 23,5 |
| M | 9-4-38 | 9 | 22,3 | 18-4-38 | 11 | 20,8 | 29-4-38 | 12 | 23,0 | 11-5-38 | 21 | 18,6 | 53 | 19,5 |

A atividade das larvas é geralmente maior no período compreendido entre 8 e 11 horas; nessa fase dos dias claros elas são facilmente vistas locomovendo-se e galgando as partes adjacentes mais altas das plantas, porém evitando sempre as hastes e folhas novas. A sua preferência pelas partes bem clorofiladas, pelo menos nos citrus, é comum.

Escolhido o local, a larva se fixa e inicia a sua primeira exsudação cerosa. O tempo necessario para essa secreção é variável, porém não excede geralmente de um dia. Essa secreção inicial muito se assemelha a uma boina branca, o que justifica a denominação de "White Cap" usada pelos autores inglêses e norte-americanos. Dois a quatro dias mais tarde, consoante a temperatura dominante, dá-se a primeira secreção marginal, de coloração acinzentada, e a larva prepara-se para a primeira muda.

### PRIMEIRA MUDA

Decorridos oito a vinte e cinco dias de duração do primeiro estádio (Séries *C* e *J* tabela 6), as larvas iniciam a primeira muda. Esta fase caracterisa-se por um leve escurecimento das secreções havidas durante o período ativo, pela queda das patas, das antenas, pelo formato circular que as larvas adquirem, e ainda pela aderência do inseto ao respectivo escudo. A exuvia adapta-se á parte ventral do escudo a guiza de um vidro de relogio, durante o tempo de duração da muda. A duração da primeira muda variou, segundo a temperatura, de 5 dias (Série *L*) a 21 dias, (Série *B*) (tabela 6).

Com o progresso da muda a secreção do primeiro estádio adquire por transparência uma coloração um tanto alaranjada, devido ao reflexo interno da côr avermelhada da exuvia.

### SEGUNDO ESTÁDIO

P e r í o d o  a t i v o — Durante este período as larvas e respectivas escamas tornam-se novamente independentes, isto é, desaparece a película ventral, possibilitando assim a remoção da escama sem que também o inseto se destaque do hospedeiro. Todavia, o pigidio continúa mais ou menos preso ao bordo da escama por filamentos cerosos, o que indica estar a larva continuando a elaboração da sua escama.

Nessa fase ha uma segunda secreção de alargamento marginal, comum aos dois sexos, porém neste caso de diâmetro mais avantajado nas escamas femininas. Esta secreção, de coloração acinzentada, encerra na parte central um núcleo alaranjado constituido pela exuvia da primeira muda.

A duração desse período, em dois anos de observações sucessivas, oscilou entre 5 e 21 dias (Séries *K* e *B* tabela 6), com vários períodos intermediários, cuja grandeza dependeu sempre e principalmente do fator temperatura.

Desta fase ao estádio adulto ha grande divergência na evolução dos sexos. As fêmeas preparam-se para uma segunda muda, enquanto os machos passam à prepupa, pupa e finalmente ao estádio adulto. Tabela 7.

### SEGUNDA MUDA

Como se referiu acima, só as larvas femininas têm esta fase evolutiva.

A segunda secreção marginal das escamas elaboradas durante o segundo "período ativo" nas escamas masculinas, escurece da periferia para o centro até a tonalidade marrom escura. Dias depois, ha a terceira secreção marginal, elabo-

TABELA 7

Desenvolvimento dos machos de *Chrysomphalus aonidum* L. com duração das diferentes fases de metamorfose, em relação com a temperatura

| Série de plantas infestadas | 1.º Estádio | | | | | | 2.º Estádio | | | | | | 3.º Estádio | | | Adulto | Período total de larva a adulto | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Período ativo | | | Período de Muda | | | Período ativo | | | Período prepupal | | | Período pupal | | | Emergência do adulto | | |
| | Início | Duração em dias | Temp. º C. | Início | Duração em dias | Temp. º C. | Início | Duração em dias | Temp. º C. | Início | Duração em dias | Temp. º C. | Início | Duração em dias | Temp. º C. | Data | Dias | Temp. º C. |
| A | 2-4-37 | 9 | 22,5 | 11-4-37 | 17 | 17,6 | 28-4-37 | 26 | 19,6 | 24-5-37 | 9 | 16,7 | 2-6-37 | 12 | 16,9 | 14-6-37 | 73 | 19,3 |
| B | 5-5-37 | 19 | 19,6 | 24-5-37 | 21 | 17,1 | 14-6-37 | 36 | 18,2 | 20-7-37 | 6 | 21,2 | 26-7-37 | 7 | 18,2 | 2-8-37 | 91 | 18,8 |
| C | 9-6-37 | 25 | 18,5 | 4-7-37 | 15 | 19,1 | 19-7-37 | 25 | 20,0 | 13-8-37 | 3 | 22,5 | 16-8-37 | 4 | 23,1 | 20-8-37 | 72 | 19,5 |
| D | 2-7-37 | 19 | 19,4 | 21-7-37 | 14 | 20,2 | 4-8-37 | 21 | 21,8 | 25-8-37 | 5 | 20,2 | 30-8-37 | 10 | 20,3 | 9-9-37 | 69 | 19,8 |
| E | 6-8-37 | 12 | 21,5 | 18-8-37 | 14 | 19,5 | 1-9-37 | 23 | 21,7 | 24-9-37 | 3 | 22,6 | 27-9-37 | 4 | 23,5 | 1-10-37 | 56 | 20,7 |
| F | 3-9-37 | 14 | 21,2 | 17-9-37 | 7 | 24,7 | 24-9-37 | 17 | 22,7 | 11-10-37 | 2 | 22,4 | 13-10-37 | 9 | 20,5 | 22-10-37 | 49 | 21,6 |
| G | 6-10-37 | 12 | 21,7 | 18-10-37 | 11 | 21,4 | 29-10-37 | 16 | 25,1 | 14-11-37 | 2 | 24,9 | 16-11-37 | 8 | 20,3 | 24-11-37 | 49 | 21,5 |
| H | 8-11-37 | 8 | 22,9 | 16-11-37 | 13 | 21,9 | 29-11-37 | 10 | 25,7 | 9-12-37 | 4 | 23,0 | 13-12-37 | 7 | 21,6 | 20-12-37 | 42 | 22,3 |
| I | 6-12-37 | 7 | 23,3 | 13-12-37 | 10 | 22,2 | 23-12-37 | 15 | 23,2 | 7-1-38 | 3 | 25,8 | 10-1-38 | 7 | 24,5 | 17-1-38 | 42 | 22,2 |
| J | 7-1-38 | 8 | 25,4 | 15-1-38 | 6 | 24,0 | 21-1-38 | 10 | 25,6 | 31-1-38 | 2 | 26,6 | 2-2-38 | 5 | 25,7 | 7-2-38 | 31 | 25,3 |
| K | 1-2-38 | 9 | 25,0 | 10-2-38 | 8 | 23,5 | 18-2-38 | 12 | 24,5 | 2-3-38 | 5 | 24,7 | 7-3-38 | 7 | 24,7 | 14-3-38 | 41 | 24,1 |
| L | 8-3-38 | 10 | 23,4 | 18-3-38 | 5 | 24,5 | 23-3-38 | 15 | 23,3 | 7-4-38 | 4 | 24,0 | 11-4-38 | 4 | 20,7 | 15-4-38 | 38 | 23,5 |
| M | 9-4-38 | 9 | 22,3 | 18-4-38 | 11 | 20,8 | 29-4-38 | 25 | 19,0 | 24-5-38 | 6 | 18,3 | 30-5-38 | 6 | 19,0 | 6-6-38 | 57 | 19,8 |

rada por este sexo, a qual consiste numa saliência lateral correspondente ao pigidio do inseto. O macho torna-se então alongado e dotado de quatro olhos pretos, dois dos quais, apenas, acompanham a evolução do inseto até o estádio adulto.

Enquanto o macho passa por essas fases, a fêmea, no mesmo período, processa a sua segunda muda.

Nesta, ao contrario do que se nota nas escamas masculinas, o escudo torna-se inicialmente alaranjado, para aumentar de intensidade até o alaranjado intenso proveniente do reflexo interno da exuvia incorporada à escama.

Como na primeira muda, também nesta o inseto e respectiva escama se ligam intimamente. A película ventral, notada na primeira muda, igualmente resurge nesta, encerrando o inseto no interior do seu escudo.

A duração da segunda muda nas condições destas observações variou de 6 a 28 dias, (tabela 6). O fim desta muda marca o início do terceiro estádio do inseto e é facilmente perceptivel pela facilidade de remoção da escama sem afetar o inseto, e pela coloração fortemente alaranjada e generalizada sôbre toda a escama, imprimida pelo reflexo conjunto das exuvias da primeira e segunda mudas incorporadas à escama.

As tabelas 6 e 7 dão o resumo das observações efetuadas sôbre 13 séries de dez plantas, infestadas em mêses sucessivos a partir de Abril de 1937 e repetidas até Abril de 1939.

Nessas tabelas está consignada a duração de cada fase evolutiva do inseto, ao lado da média termométrica correspondente a cada uma delas, tanto para as fêmeas (tabela 6) como para os machos (tabela 7).

Pelo confronto dos períodos evolutivos de larvas masculinas e femininas, de uma mesma infestação, portanto de larvas da mesma idade, nota-se que a evolução das femininas em regra geral requer menos tempo do que as masculinas. Durante o inverno essa diferença monta não raro a 10 dias, embora os machos se fixem sempre nas partes mais insoladas do hospedeiro.

Na série *A*, de plantas infestadas em Abril de 1937 (tabela 6), as fêmeas entraram no terceiro estádio no 66.º dia, enquanto os machos da mesma geração, (tabela 7), só no 73.º dia completaram o seu ciclo larval, portanto 7 dias mais tarde. A discrepância é maior, portanto, quando a evolução larval se completa na estação fria.

## NÚMERO DE GERAÇÕES

A imbricação das gerações do *Chrysomphalus aonidum* L. impossibilita a observação do seu número sôbre uma única planta. Para se evitar esse obstáculo adotou-se o processo seguinte: com as primeiras larvas oriundas de uma geração, infestou-se outra planta de citrus indene, repetindo-se a operação para cada geração.

Com as observações assim conduzidas de Março de 1937 a Março de 1939, foram contadas nove gerações, ou sejam aproximadamente 4,5 por ano, (Tabela 8).

TABELA 8

Número de gerações do *Chrysomphalus aonidum L.*
verificadas em condições naturais
durante 1937 a 1939

Campinas

| 1937 a 1939 | Inicio | Fim | Duração em dias |
|---|---|---|---|
| 1.º | 9-3-37 | 19- 6-37 | 102 |
| 2.º | 19-6-37 | 20-10-37 | 123 |
| 3.º | 20-10-37 | 25-12-37 | 66 |
| 4.º | 25-12-37 | 12- 2-38 | 49 |
| 5.º | 12- 2-38 | 2- 4-38 | 59 |
| 6.º | 2- 4-38 | 10- 8-38 | 128 |
| 7.º | 10- 8-38 | 24-11-38 | 106 |
| 8.º | 24-11-38 | 26- 1-39 | 63 |
| 9.º | 26-1-39 | 24- 3-39 | 57 |

## FATORES QUE LIMITAM A MULTIPLICAÇÃO DO INSETO

### CONSIDERAÇÕES SÔBRE A MORTANDADE DAS LARVAS

De modo geral, as observações sôbre a biologia do *Chrysomphalus aonidum* L. desde o seu início, correram normalmente até Dezembro de 1937, quando surgiram os primeiros obstaculos, os quais progressivamente se foram agravando, até Março de 1938, pela alta mortandade de coccideo em todos os estádios evolutivos. De Dezembro de 1938 a Março de 1939, fato idêntico se repetiu. Houve casos de plantas fortemente infestadas apresentarem, no fim dos mêses citados, unicamente os vestigios dos coccideos, tal a redução verificada.

Acontecendo, porém, que a maioria das larvas fixadas sob a escama materna, assim como a totalidade das protegidas pelas células de celulóide, sempre evoluiram e procrearam normalmente, mesmo durante os mêses críticos, tal fato contribuiu de algum modo para orientar pesquisas sôbre as causas possivelmente determinantes do fenômeno.

A maior porcentagem de insetos parasitados ocorre exatamente nessa época, porém o parasitismo por si só, embora preponderante, era insuficiente para satisfatoriamente elucidar a questão.

Foi então que o autor iniciou uma série de pesquisas objetivando melhores esclarecimentos. Os resultados das observações ao sol e á

sombra foram sempre idênticos. Não eram portanto, esses, os fatores responsáveis pela morte do inseto.

Foi lembrada a possibilidade da influência do estado fisiológico da planta nessa época, ou a resistência individual de algumas delas.

Várias plantas foram então fortemente infestadas, e como o vidro de lampeão (estampa 97) permitia uma melhor observação, em relação às células de celulóide, pelo fato de encerrar uma boa porção da planta infestada, foi êle utilizado, para que se pudesse observar sôbre uma mesma planta a evolução do inseto dentro e fóra do abrigo.

Nas extremidades do vidro foram atados suplementos de pano para melhor vedar a entrada a outros insetos.

Resultado — As larvas isoladas do meio externo atingiram a maturidade e procrearam, enquanto as outras, fixadas sôbre a parte exposta da mesma planta, morreram.

O estado fisiológico da planta foi também, portanto, excluido da lista das suposições. De todas elas talvez seja mais cabivel a hipótese da influência da umidade relativa.

Tanto no interior do vidro de lampeão, como da célula de celulóide, a umidade relativa é sempre mais elevada e constante do que a externa.

A estação em que se verificou a mortandade é por sua vez a época em que maiores oscilações se observam no estado higrométrico do ar.

As altas temperaturas registradas nesta fase do ano, as quais são geralmente prenuncio de chuva, determinam bruscas e acentuadas oscilações da porcentagem de umidade relativa do ar. Não são raros os casos de oscilações entre 30 e 90% no mesmo dia, o que praticamente não se dará dentro dos recipientes, quer de vidro quer de celulóide, desde que se considere a pequena circulação de ar no seu interior e a função reguladora da umidade do ambiente, que as folhas da planta exercem pela sua transpiração.

Em maior ou menor porcentagem, devido ao parasitismo ou não, o fato é que em qualquer época uma grande parte das proles deste coccideo morre durante o período larval. Embora seja apreciável a mortandade, muito dificilmente se poderá saber a sua verdadeira extensão; todavia alguns ensaios foram efetuados com esse objetivo.

As observações, que compreenderam um período de onze mêses (tabela 9), foram iniciadas em Junho de 1938 e prolongadas até Abril de 1939.

Atingida a sua maturidade, antes, porém, de iniciarem a oviposição, procedeu-se á eliminação dos insetos, deixando apenas um por folha da planta. Para evitar a evasão de suas larvas e também para

que se pudesse proceder á contagem, separadamente, das proles, por unidade, os pecíolos das folhas foram tratados com uma substância viscosa e inalterável *(Tanglefoot)*.

As larvas oriundas de cada uma dessas fêmeas eram assim forçadas a se fixarem sôbre a mesma folha, ao lado da progenitora, tanto nas folhas protegidas da planta testemunha como nas outras.

Quando as proles atingiram o máximo crescimento, fez-se a primeira contagem, e depois da oviposição delas, a segunda, resultando dessas contagens os dados mencionados na tabela 9.

TABELA 9

Porcentagens de larvas evoluidas em condições naturais e em ambiente artificial de Junho de 1938 a Abril de 1939

| Data das observações | Larvas Femininas que evoluiram Média por folha | | Porcentagem que procreou | | Mêses da postura | Parasitismo |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Test. protegida | Condições naturais | Test. protegida | Condições naturais | | |
| Junho . . . | 55,3 | 17,6 | 95 % | 31,8 % | Setembro e Out. | — |
| Julho . . . | 93,0 | 25,7 | 98 % | 27,6 % | Out. e Novembro | — |
| Agosto . . | 99,1 | 11,5 | 96 5% | 11,6 % | Nov. e Dezembro | fraco |
| Setembro . . | 122,1 | 35,2 | 97 % | 28,7 % | Novembro a Jan. | fraco |
| Outubro . . | 86,3 | 30,0 | 90 % | 34,4 % | Dez. e Janeiro | regular |
| Novembro . | 85,5 | 14,0 | 88 % | 17,3 % | Jan. e Fevereiro | forte |
| Dezembro . | 76,2 | parasita | 90 % | 0, % | Fev. e Março | forte |
| 1939 | | | | | | |
| Janeiro . . | 64,1 | parasita | 95 % | 0, % | Março e Abril | fraco |
| Fevereiro . . | 67,0 | » | 98 % | 0, % | Abril a Julho | — |
| Março . . . | 48,5 | 23,2 | 97 5% | 93,1 % | Junho a Setembro | — |
| Abril . . . | 87,5 | 51,0 | 80 % | 12,4 % | Agosto a Outubro | — |

Pelos dados da tabela 9 conclue-se que a mortandade do inseto é grande em todos os estádios evolutivos e em qualquer estação, e mais acentuada naqueles cujo ciclo vital coincide com os mêses críticos: Dezembro, Janeiro, Fevereiro e Março.

Embora não determinado, um fator de contrôle natural da praga existe, e independentemente do conhecimento de sua natureza, os resultados das observações mostram que a sua ação se faz sentir em qualquer época do ano, reduzindo grandemente a população da praga.

Como o parasitismo só ocorre a partir de Dezembro, para culminar em Março e cessar em Junho de cada ano, é óbvio que no correr desses mêses a praga está sempre sujeita a uma ação conjunta dos fatores controladores.

Nas plantas utilizadas para estas observações a mortandade do inseto durante esta fase do ano foi de ordem tal, que nem um inseto chegou a procrear. Uma parte da população morreu sem causa aparente e a outra foi eliminada pelo alto parasitismo constatado.

O recebimento de material infestado de várias localidades do município, para as infestações procedidas mensalmente, foi talvez a causa da introdução de várias espécies dos parasitas microhiminopteros, cuja atuação em área tão restrita redundou no que se verifica (na tabela 9) : interrupção total das observações durante os mêses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro.

Si o fenômeno se relacionasse com alguma espécie de fungo, não haveria razão para que a sua ação se restringisse apenas aos insetos desprotegidos, mesmo porque o ambiente artificial estabelecido para as testemunhas, segundo parece, não era de ordem a evitar aí a sua vegetação, mas, ao contrário, deveria possivelmente favorece-la.

## INIMIGOS NATURAIS

Além de pelo menos duas espécies de coccinelideos *(Pentilia egena* MULS. e *Azya luteipes* MULS.) predadores de grande eficiência no combate a essa praga em todas as estações, e muito especialmente no verão, foram também constatadas um Halticideo indeterminado, de notavel eficiencia e seis espécies microhimenopteras, entre as quais figuram duas identificadas como novas para a ciência.

As espécies são: *Aphytis* n. sp.; *Marietta* n. sp.; *Aspidiotiphagus lounsburyi* (BERLESE & PAOLI) ; *Aspidiotiphagus citrinus* (CRAW.) ; *Thysanus fax* (GIRAULT) ; *Thysanus townsend* (ASHM.) ; todas gentilmente determinadas por A. B. GAHAN, do Museu Nacional dos Estados Unidos.

Estas espécies são todas mui frequentes de Dezembro a Junho, embaraçando seriamente a proliferação do *Chrysomphalus aonidum* L. como se infere pelos dados da tabela 10, na qual se expressam englobadamente as porcentagens do parasitismo.

TABELA 10
Parasitismo do *Chrysomphalus aonidum*,
na Fazenda Mato Dentro
Campinas 1938

| 1938 | Porcentagem de femeas parasitadas | Porcentagem de machos parasitados |
|---|---|---|
| Março | 59,9 | 85,0 |
| Abril | 50,5 | 68,2 |
| Maio | 38,9 | 55,5 |
| Junho | 39,0 | — |

## CONCLUSÃO

Pelo confronto dos resultados aquí obtidos sôbre a biologia do *Chrysomphalus aonidum* L., com os dados dos trabalhos publicados no exterior, conclue-se que a espécie tem aquí, com pequenas variantes, o mesmo comportamento, sob todos os aspectos: fases evolutivas, capacidade ovipositora, longevidade, etc.

Considerada porém sob o aspecto econômico, para gáudio de nossos citricultores, pelo menos até a época presente ela não constitue aquí praga séria e portanto danosa como se tem revelado nas regiões citricolas da África, Palestina, Ilha Formosa, etc.

O ponto vulnerável do ciclo vital da espécie, na região de Campinas, coincide com os mêses de Janeiro, Fevereiro e Março: 1.º) porque o ciclo da espécie se reduz ao mínimo e as gerações se sucedem com mais frequência; 2.º) porque, embora as gerações se sucedam com intervalos mínimos, a mortandade das larvas em todos os seus estádios é elevadissima; 3.º) porque as larvas nascidas no correr destes mêses se fixam de preferência sôbre as partes livres da planta hospedeira e não sob a escama materna, como faz a maioria das nascidas durante a estação fria, sendo portanto mais acessiveis aos agentes de contrôle.

Finalmente, a predileção da espécie pelas plantas novas, aliada á não frutificação destas, permitem pulverizações, que para outros casos talvez fossem contra-indicadas.

## NOTES ON THE BIOLOGY OF "CHRYSOMPHALUS AONIDUM (L., 1758)" (HOMOPTERA) IN THE STATE OF S. PAULO-BRAZIL


### *Abstract*

*Investigations on the biology of Chrysomphalus aonidum* L. *in the State of S. Paulo, were conducted at Campinas during the seasons of 1937-1939.*

*The average longevity ranged from 83 to 204 days according to the season.*

*The maximun longevity was recorded for unfertilized females; one individual lived 9 months.*

*Mating occurs soon after the second molt, and oviposition begins from 23 to 70 days later according to the season.*

*The oviposition period ranged from 28 to 107 days. During January and February the average number of eggs per female was 171 and the daily rate of egg-deposition was 6.10; from June to September the average number per female was 97 and the daily rate was 0.99.*

*The maximun individual oviposition was 285 eggs.*

*The incubation period ranged from one to 24 hours.*

*The proportion of sexes is approximately equal. Nine generations were observed in two years.*

*Reproduction by parthenogenesis did not occur and unfertilized females did not oviposit.*

*Six species of natural enemies were found attacking Chrysomphalus aonidum: Aphytis n. sp., Marietta n. sp., Aspidiotiphagus lounsburyi'* (BERLESE & PAOLI), *Aspidiotiphagus citrinus* (CRAW.), *Thysanus fax* (GIRAULT) *and Thysanus townsend* (ASHM.).

## BIBLIOGRAFIA

1 — BALACHOWSKY, A. — 1932 — Étude des Coccides du bassin Méditerranée. Paris, Lechevalier. *Encyclopédie Entomologique.*

2 — CHWEIG, C. & GRUNBERG, A. — 1936 — The problem of Black Scale (Chrysomphalus ficus ASHM.) in Palestine. *Bull. Ent. Res.* 27: 677-713, com figs.

3 — COSTA LIMA, A. M. — 1936 — *Terceiro Catalogo dos Insetos que vivem nas Plantas do Brasil.* Ed.: Minist. da Agric., Rio de Janeiro. 460 pp.

4 — PRISNER, H. — 1931 — On the biology of Chrysomphalus ficus (RIL.). *Tec. and Scient. Serv. Minist. of Agriculture,* Egypt. Cairo. *Bull.* n.º 117, 19 pp.

5 — QUAYLE, H. J. — 1932 — Biology and Control of Citrus Insects and Mites. *Bull. Calif. Agric. Exp. Sta.* n.º 542, 87 pp. com figs.

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 96

Fig. *A* — Detalhes sôbre a construção das células de feltro e celulóide e sua fixação na folha da planta.

Fig. *B* — Vista de uma laranjeira com várias células de celulóide usadas no curso das observações, para a estimação do número de larvas por fêmea.

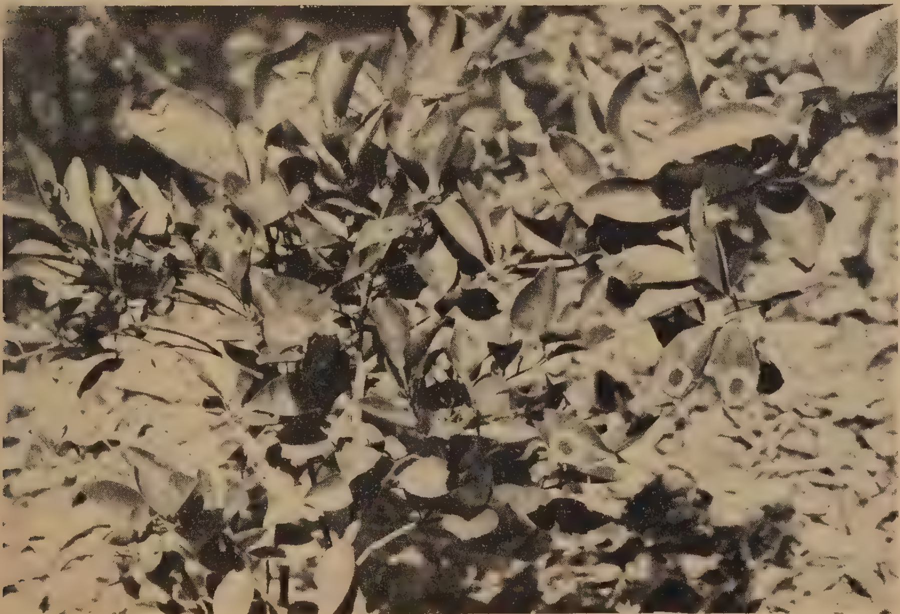
### Estampa 97

— Vista de um vidro de lampeão do tipo usado para isolar uma porção da planta infestada.





*A*



*B*



# SÔBRE UM CASO DE SCHISTOSOMOSE INTESTINAL AUTÓCTONE DE SANTOS

## APENDICITE POR "SCHISTOSOMA MANSONI"*

PELO

Dr. D. M. Gonzalez Torres

Do Laboratorio Paulista de Biologia

Com as estampas 98-102

No dia 19 de Agôsto de 1939, o Dr. Edson de Oliveira remeteu ao Laboratório Paulista de Biologia um apêndice extirpado, na véspera, de um doente que apresentava um quadro clínico de apendicite aguda.

O distinto colega nos adiantou a possibilidade de tratar-se de uma T. B. C. intestinal, posto que, durante a operação, êle observara a presença de numerosos grânulos amarelos do tamanho da cabeça de um alfinete, disseminados no intestino grosso, no delgado e no peritônio parietal, visíveis no campo operatório.

Nos primeiros exames dos córtes histológicos, já pudémos notar a presença, na parede apendicular, de numerosos folículos pseudotuberculosos, muitos deles centrados por ovos de *Schistosoma mansoni*, ovos que também foram encontrados em uma pequena quantidade de fézes contidas na cavidade apendicular, e, posteriormente, em grande quantidade, nas fézes do enfermo.

Estávamos, pois, em presença de um caso de apendicite por Schistosomas, e, como o doente provinha de Santos, lugar em que nascera e de onde nunca saíu, o interêsse aumentava por tratar-se de um caso autóctone, num lugar onde desde muitos anos não se descrevem tais casos (desde a publicação de ARANTES em 1923, e MACIEL em 1925).

Ao interêsse do quadro clínico e da circunstância operatória que levou ao diagnóstico, reune-se, portanto, o da localização geográfica.

### HISTÓRIA CLÍNICA

E. R. C., brasileiro, branco, de 24 anos, casado, datilógrafo. Residente em Santos, lugar de onde nunca saíu; mora no bairro de Santa Maria, zona baixa e úmida, cruzada de canais d'agua.

Pai português, tendo vindo diretamente de Portugal, morou 30 anos em Santos e morreu em 9 de Abril de 1939.

Mãe portuguesa, falecida em 1920.

Entre os antecedentes pessoáis, o doente lembra-se de ter apanhado maleita em 1936 e de ter feito, nesse mesmo ano, uma cura contra

* Comunicado à "Ass. Paulista de Medicina" em 4-X-1939.

solitária, expulsando esta, juntamente com um verme que, provavelmente, era um *Enterobius vermicularis.*

Em fins de Fevereiro ou nos primeiros dias de março dêste ano, teve necessidade de trabalhar com barro do leito de um canal de água que corre junto à sua casa; depois dêsse trabalho foi atacado de pruridos fortes nos pés; êstes e as pernas incharam-se durante uns dias (uma semana).

Em fins de Abril (23-24) apresentou sintomas gripáis (febre, fraqueza, tosse, coriza), que duraram 10 dias, mais ou menos. Na primeira quinzena de Máio foi atacado de uma afecção, diagnosticada como inflamação da vesícula biliar e do fígado, com febre entre 38 e 39°, sem calefrios, com dôr localizada na região vesicular ou hepática, fraqueza, inapetência e diarréa. Êste estado durou 15 a 20 dias, perdendo o doente 8 kg. de pêso. Foi tratado, desde o dia 15 de Máio, com Bileína, glicose, Bilivix, etc., e, em consequência da doença, ficoulhe uma diarréa que sómente se acalmou durante sua convalescença de um mês (Junho) em Santo André, perto de São Paulo.

Alí, recuperou 4 kg.

Durante a doença que acabámos de relatar, o enfermo experimentou por dois dias dificuldades para urinar, fazendo-o por gotas, com esfôrço, sem dôr alguma nem outros transtornos.

Desde sua convalescença êle defecou fézes pastosas, isto duas vezes por dia; queixava-se, às vezes, de dôres difusas no ventre, tendo, então, descargas diarréicas durante 1 a 2 dias, com defecações de 3 a 4 vezes, diárias. Sempre apirético e com bom apetite.

Na sexta-feira, 11 de Agôsto, na rua, aparentando bôa saúde, teve um acesso de forte dôr na fossa ilíaca direita, com retraimento da perna correspondente. O acesso acalmou com o repouso, voltando a repetir-se no domingo, dois dias depois, obrigando-o, desta vez, a chamar um médico, que diagnosticou apendicite e manifestou a necessidade de uma intervenção. Trazido a São Paulo, na terça-feira, foi operado no Hospital da Cruz Azul, na quinta-feira, dia 17, pelo Dr. Edson de Oliveira, que nos enviou o apêndice para exame.

No dia 22, quando visitámos o enfermo, êste se achava com diarréa havia dois dias, porém com fezes não sanguinolentas. Examinado, no dia seguinte, com permissão do Dr. Oliveira, a quem agradecemos mui especialmente o haver-nos facilitado êste estudo, notámos:

Febre de 39° com 100 pulsações por minuto; emagrecimento; ligeira anemia das mucosas, sem dôres ou transtornos subjetivos. Ventre um pouco timpanizado por gazes; continúa a diarréa. Baço ligeiramente hipertrofiado, percutível, porém não palpável. Fígado e vesícula sem particularidades.

Não apresenta prolápso retal, nem fístula ou fissura anal. Pressão sanguínea: Mx: 11; Mn: 7.

Nunca teve defecações sanguinolentas.

Quadro térmico:

| Agosto 1939. | | | | Defecações |
|---|---|---|---|---|
| 16 | 38° | 38°2 | | |
| 17 | 38°6 | 38°2 | (operado) | |
| 18 | 38°6 | 38°4 | | |
| 19 | 38°6 | 38°4 | | |
| 20 | 38°5 | 38°4 | | |
| 21 | 38°6 | 39° | | 3 vezes |
| 22 | 38°6 | 38°1 | | 2 " |
| 23 | 39° | etc. | | 2 " |

## ANATOMIA PATOLÓGICA DO APÊNDICE

Apêndice volumoso, de 9 cms. de comprimento por quási 1 cm. de diâmetro, branco, ligeiramente congestionado, um pouco mole, apresentando, mais ou menos na parte central, uma zona amolecida. Um córte neste nível mostra uma necrose parietal. Foram praticados córtes seriados, transversáis, e um córte longitudinal da ponta.

Fixação: formol 10 %; Bouin.
Inclusão: parafina.
Coloração: Hematoxilina-Eosina
Ziehl Neelsen
Unna.

## HISTOLOGIA

Epitélio intestinal em certas partes desprendido.

Corion mucoso intensamente infiltrado, sobre-tudo por eosinófilos e poucos linfocitos e plasmocitos. Em determinados campos, vêem-se verdadeiros ninhos de eosinófilos. Congestão dos capilares, sobre-tudo subepitelial, e hemorragia intersticial. Criptas glandulares sem particularidades, apresentando dilatações e, no seu conteúdo, ovos de *Schistosoma*. O conjunto da mucosa aparece adensado em virtude da infiltração, dos nódulos, e pela hiperplasia dos folículos fechados.

Junto a êstes folículos, e sempre fóra deles, notam-se nódulos pseudotuberculosos; ao nível da ponta e mais ou menos até 1 cm. dela, só aparece a hiperplasia dos folículos fechados; só mais para cima é que se notam os nódulos pseudotuberculosos.

Êstes nódulos são formados por:

a) Zona central, que póde ser necrótica, ou ocupada por células gigantes (algumas do tipo LANGHANS e a maioria do tipo "corpo extranho") e muitas vezes por ovos de vermes que se reconhecem como de *Schistosoma mansoni*.

Mais raramente essa zona central é formada por um pseudoabcesso (ovos de *Schistosoma* no meio de leucocitos e restos celulares).

Êstes ovos são ovais, às vezes deformados, com um esporão lateral, e sua cápsula, bem corada, sobre-tudo pelo ZIEHL (em vermelho vivo); o esporão está perto de um dos polos e dirigido para trás. Êstes ovos correspondem aos que foram observados no exame diréto.

Observámo-los, também, dentro dos capilares, superficialmente no córion mucoso, diretamente sob o epitélio de revestimento. Quando não ocupam o centro de um nódulo, isto sempre na espessura da mucosa, acham-se rodeados de uma zona de infiltração de eosinófilos.

Alguns ovos acham-se livres na cavidade apendicular, notados sobre-tudo pela coloração de Ziehl Neelsen, que permite localizá-los rapidamente, por corar sua cápsula em vermelho vivo.

b) Por fóra da zona central que acabámos de descrever, os nódulos apresentam, em muitos casos, uma palissada histiocitária bem nítida e, mais por fóra ainda,

c) uma zona que se extende mais ou menos afastada, de intensa infiltração, particularmente notável de eosinófilos, e, em menor número, linfocitos e plasmocitos. Mais distante, nota-se uma mobilização discreta de fibroblastos, em fórma concêntrica e, depois, zonas de ligeira fibrose.

Êstes nódulos pseudotuberculosos acham-se na mucosa e submucosa, exceto no tecido muscular. Nas camadas muscular e subperitonial, sobre-tudo perto dos fócos inflamatórios submucosos mais profundos, ha zonas de discreta infiltração por eosinófilos com raros fócos nódulares de centro necrosado; congestão vascular de toda a espessura da parede e discreta infiltração perivascular; alguns vasos com endovascularites.

Não se notam lesões dos plexos nervosos.

Na cavidade apendicular, veem-se numerosos restos celulares, epitélio de revestimento desprendido, elementos leucocitários, particularmente eosinófilos, alguns linfocitos, macrófagos, e alguns ovos de *Schistosoma.*

## DIAGNÓSTICO

Apendicite nodular crônica por *Schistosoma.* Surto congestivo.

Examinadas as fézes contidas no interior do apêndice e conservadas no fixador com a peça de reserva, notámos:

Alguns ovos de *Schistosoma mansoni,* ovais, de diâmetro maior entre 110 e 140 micras, e transversal entre 50 e 75 micras, de cutícula amarela e esporão lateral bem nítido, perto de um dos polos. Raros ovos de *Trichuris.* Raspando ligeiramente a mucosa apendicular da peça de reserva, obtivémos escasso material, no qual foram também achados alguns ovos de *Schistosoma.*

## FEZES FRESCAS (22-23 Agôsto, 1939)

Fezes pastosas, com numerosos ovos de *Schistosoma mansoni,* de tamanho variável entre 120 e 140 micras, no seu diâmetro maior, por 50 a 80 no transversal; alguns miracídios dentro dos ovos, e outros livres, em movimento (50 a 100, por 140 a 330 micras); raros ovos de *Necator* e *Trichuris trichiura;* leucocitos, raras hemacias, *Entamoeba coli* e *Blastocystis.*

HEMOGRAMA

22 Agôsto 1939:

| | |
|---|---|
| jovens | 1 % |
| bastonetes | 1 % |
| segmentados | 48 % |
| eosinófilos | 35 % |
| linfocitos | 13 % |
| monocitos | 2 % |

Sem alterações anêmicas das hemácias.
4 Setembro 1939:

| | |
|---|---|
| hemácias | 4.200.000/mm3 |
| leucocitos | 9.000/mm3 |
| hemoglobina | 70 % |

URINA Sem particularidades.

ALGUNS CARACTÉRES E CICLO EVOLUTIVO DO "SCHISTOSOMA MANSONI". (BRUMPT, LUTZ, PIRAJÁ DA SILVA, etc.)

O *Schistosoma mansoni* é um verme que pertence à família dos Schistosomidos, ordem dos Trematódeos, classe dos Platelmintos, e secção dos Metazoários.

Os indivíduos adultos acham-se, no homem, frequentemente agrupados na veia porta ou em suas ramificações, especialmente na mesaraica pequena.

O macho é chato, enrolado sôbre seu eixo longitudinal, formando uma caneleta (canal ginecóforo) onde leva uma ou várias fêmeas.

Mede 12 mm. de comprimento, por ½ de largura.

Na extremidade anterior tem duas ventosas (oral e ventral). O corpo tem musculatura bem desenvolvida, recoberta de pele, com escamas agudas.

A fêmea é cilíndrica, mais comprida (14-15 mm.), de escassa musculatura, pele sem escamas, ou com muito poucas.

Como o macho não tem órgão copulador, derrama o esperma no canal ginecóforo onde se encontram as fêmeas; êste esperma penetra no orifício vaginal por capilaridade.

Ambos os indivíduos pódem também evoluir em ratos, monos, coelhos, etc.

Quando a fêmea fecundada vai pôr ovos, sái do canal ginecóforo do macho, e, por um tropismo especial, ainda não explicado, vái até o plexo hemorroidário, através das veias hemorroidárias superiores, ramificações da mesaráica pequena. Aí, põe ovos que serão eliminados, geralmente ao nível do cólon descendente e do reto.

Êsses ovos atravessam a parede intestinal, vencendo a corrente sanguínea; chegam à mucosa até muito superficialmente, e, por ruptura dos capilares que os contem, são libertados, causando pequenas hemorragias.

Às vezes, ficam detidos em seu caminho, e ao redor deles se formam granulomas pseudotuberculosos.

Segundo a observação de H. MACIEL, a eliminação normal dos ovos dá-se dentro das 24 horas da postura, tendo a temperatura am-

biente grande influência, pois os ovos são eliminados em maior quantidade e com maior frequência nos dias em que a temperatura sofre grandes oscilações.

Os ovos são ovais, com um esporão lateral perto do polo posterior e dirigido para trás. Seu tamanho varía, segundo BRUMPT, de 112 a 162 micras de comprimento, por 60 a 70 de largura; o esporão mede 20 micras. Tem uma membrana externa ou córion, de côr amarelada, e uma membrana interior ou amnios.

Dentro dos ovos normais pode-se ver um embrião revestido de cílios; em condições favoráveis de luz e calôr, os ovos eliminados com as fézes e caídos geralmente em terreno pantanoso ou na água, abrem sua casca por uma fenda transversal, para ficar livre a larva ciliada ou miracídio. Os ovos podem tambem abrir-se na cavidade intestinal, quando ha diarréa.

Os miracídios, livres na água, procuram seu hóspede intermediário, que são moluscos do gênero *Planorbis*.

Os miracídios, que só vivem 24 horas, penetram, geralmente, pelas antenas do hóspede, e, cinco ou seis dias depois, se enquistam (esporocisto) e crescem, constituindo, ao fim de mais cinco ou seis dias, massa alongada de nome esporocísto secundário ou redia, com vestígios de aparelho digestivo.

Estas redias emigram para o fígado do molusco, mais ou menos no dia 20°, e trinta e poucos dias depois produzem cercarias munidas de pequenos estiletes ou espinhos na extremidade anterior do corpo (onde também possuem cinco pares de glândulas cefálicas e quatro pares de flagelos vibráteis) ; sua cauda é bifurcada.

As cercarias crescem e, chegando ao seu completo desenvolvimento, sáem do caracol pelo intestino e canais que vão à superfície do corpo. Infestam, assím, as águas, e, perdendo a cauda, penetram na pele ou nas mucosas do homem, causando uma irritação local pruriginosa; também são ingeridos com as águas.

Entram na corrente circulatória e se localizam nos vasos da veia porta, sobre-tudo na pequena mesaráica, crescendo e constituindo os indivíduos adultos, para recomeçarem o ciclo descrito.

O desenvolvimento completo dura 5 semanas, e os ovos se encontram nas fézes cinco a seis semanas depois da entrada das cercarias.

A duração da vida de um adulto é muito longa, alcançando, segundo os autores, até 15-25 anos (MACIEL).

## ASPÉCTO CLÍNICO DA SCHISTOSOMOSE INTESTINAL

O quadro clínico da *Schistosomose Mansonii* é sumamente variável; em casos de infecção violenta pode apresentar-se um quadro agudo notável, porém, na maioria das vezes passa despercebido, até que um exame de fézes, por motivo de uma colite crônica, ou pela suspeita de uma parasitose intestinal, revele a presença de ovos de *Schistosoma mansoni.*

RAMESES GIRGES, do Egito, dedicou a essa doença um estudo muito bem documentado; seguiremos esta obra neste rápido bosquejo clínico:

Período de incubação: é o que transcorre entre a entrada da cercaria e o aparecimento da febre, que é o primeiro sintoma da toxemia. Êste período, reproduzido experimentalmente, dura de 1 a 3 meses, ou de 3 a 5 semanas, segundo a experiência de GIRGES em casos humanos. A entrada, que muitas vezes passa despercebida do doente, que não prestou atenção, se produz, geralmente, pela pele das extremidades inferiores. Ao nível da entrada aparece uma pápula eritematosa, muito pruriginosa; êste prurido é causado em parte pela lesão mecânica e em parte por enzimas digestivas irritantes, secretadas pela larva durante sua penetração na pele.

A pápula dura, geralmente, um dia, e o prurido pode permanecer de 2 a 10 dias. Nosso doente apresentou êste quadro em fins de Fevereiro ou começo de Março.

Passados êstes fenomenos, geralmente, o quadro clínico é mudo, descobrindo-se a Schistosomose por um exame acidental de fézes. Uma alta eosinofilia é um resultado constante na fórmula leucocitaria.

Período de Toxemia: é o compreendido entre o inicio da febre e o aparecimento dos ovos nas fézes. Êste período é geralmente insidioso; às vezes, porém, póde adquirir um caráter de ataque agudo, sobre-tudo quando a infecção foi violenta; neste caso, 3 a 6 semanas depois da entrada, aparece febre, dôr abdominal, diarréa, congestão hepática, abatimento geral, cefaléas, vertigens, dôres musculares difusas, mais intensas na região lombar, etc. O quadro hepático agudo que apresentou nosso enfermo em Maio, corresponde seguramente a êsse período.

A febre toxemica é do tipo ectico ou septico remitente: 37°5-38° pela manhã, 39°-40° pela tarde, e pode durar até algumas semanas.

Um sintoma frequente que, para GIRGES, é de muita importância, é a urticária que se apresenta no começo; infelizmente êste sintoma passa frequentemente despercebido, pois dura um só dia, ainda que

possa prolongar-se por várias semanas. O doente apresenta tambem transtornos digestivos: anorexia, sensação de pêso depois das refeições principais, dôres abdominais difusas, constipação ou diarréa.

O fígado aumenta de volume, e, mais tarde, o baço.

Emagrecimento até emaciação; o hemograma revela uma anemia hipocrômica, leucocitose, e eosinofilia de 30 a mais %.

O diagnóstico diferencial deve ser feito com: maleita, abcesso hepático, disenteria crônica, febre intestinal, etc., e pode ser assegurado com o test de fixação do complemento.

Período intestinal ou disentérico: causado pelo acúmulo dos ovos na parede intestinal e sua passagem às fézes, com ou sem o aparecimento de sangue. Oito ou dez semanas, e, às vezes, vários meses depois da infecção, aparecem os sintomas de irritação intestinal que pódem ser tomados como os de uma colite crônica: cefaléa, abatimento geral, emagrecimento, dôres abdominais difusas, diarréas intermitentes, com fases de constipação entre elas, febre discreta entre 37 e 38°. As fézes são diarreicas, com mucosidades e pouco sangue, revelando ao exame a presença de ovos de *Schistosoma*.

Período papilomatoso: formam-se papilas e polipos na mucosa intestinal; ha ulcerações, sinais de rectite ulcerovegetante, o anus póde estar relaxado e haver até prolápso rectal. O doente apresenta os sintomas próprios de tal estado: emaciação, anemia, dôres difusas abdominais, etc.

Prognóstico: No seu período intestinal ou disentérico, que é quando geralmente se descobre a doença, o prognóstico não é máu, pois a infecção póde ser tratada e curada.

O tratamento é à base de tártaro emético, acompanhado dos tônicos necessários para levantar o estado geral do doente, curar sua anemia, etc.

Sôbre êste particular não nos extenderemos, pois que está ao alcance geral nos tratados de parasitologia e clínica.

O doente que motivou êste estudo foi medicado e continúa sendo, com Fuadina e tônicos.

## COMENTÁRIOS

O presente caso tem seu interêsse particular:

1.° — por tratar-se de um caso autóctone de Santos, lugar onde não se descreveu esta fórma desde as publicações de Arantes em 1923 e de H. Maciel em 1925.

2.º — pela circunstância de que a doença foi diagnosticada mediante um acesso agudo de apendicite, que obrigou a uma intervenção;

3.º — pela confirmação do diagnóstico pelo estudo histopatológico, e a oportunidade de prestar-se o caso para uma descrição das lesões;

4.º — si bem que, em circunstâncias raras ou fortuitas, pode o médico encontrar-se perante um quadro semelhante, devemos ter presente esta eventualidade.

S. Paulo, Setembro 1939

## ÜBER EINEN FALL VON AUTOCHTHONER "SCHISTOSOMIASIS INTESTINALIS" IN SANTOS.

### BLINDDARMENTZÜNDUNG VERSACHT DURCH "SCHISTOSOMA MANSONI"


ZUSAMMENFASSUNG

Der Verf. schildert einen Fall von autochthoner *Schistosomiasis intestinalis* in Santos.

Es handelt sich um einen Kranken, welcher nach einer akuten Krise einer Blinddarmoperation unterworfen wurde. Das histologische Studium des Blinddarms zeigte pseudotuberkulose Knötchen, in deren Zentren sich *Schistosoma mansoni*-Eier vorfanden. Während der Operation beobachtete der Chirurg am Dünndarm und Dickdarm, sowie am Bauchfell miliare Granulationen wie in Fällen von T. b. c. Das Examen des Exkrements zeigte ebenfalls starkes Vorkommen von *Schistosoma mansoni*-Eiern.

Das Interessante an diesem Falle ist, dass der Kranke, welcher in Santos geboren wurde, bis heute diese Stadt niemals verlassen hat; es handelt sich also um einen autochthonen Fall in einer Stadt, in welcher sich seit ca. 15-16 Jahren kein ähnlicher ereignet hat. Die in Brasilien beobachteten Fälle von *Schistosomiasis* kommen gewöhnlich aus den Nordstaaten, und werden in den südlichen Teilen des Landes nur selten beobachtet.

Von Interesse ist auch die Art, in welcher sich diese Krankheit dem Diagnostikum zeigte: ein akuter Anfall von Blinddarmentzündung.


———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 98

Fig. *A* — Ovo de *Schistosoma;* exame direto = grande aumento.
Fig. *B* — Ovo de *Schistosoma* centrando um microabceso. Microfoto, grande aumento a seco.

### Estampa 99

Fig. *C* — Microfoto, grande aumento a seco.
Palissada epitelioide ao redor dum ovo de *Schistosoma;* ligeira reação fibroblastica por fora.
Fig. *D* — Microfoto a pequeno aumento.
Vista de conjunto da mucosa e submucosa, que mostra alguns foliculos centrados por celulas gigantes e ovos de *Schistosomas.*

### Estampa 100

Fig. *E* — Microfoto a grande aumento a seco.
Foliculo pseudotuberculoso centrado por celulas gigantes e ovos de *Schistosoma;* por fora, celulas epitelioides, e forte infiltração por linfocitos e eosinofilos.
Fig. *F* — Microfoto, maior aumento a seco.
Ovo de *Schistosoma mansoni* no corion da mucosa, muito superficial, quasi diretamente em baixo do epitelio de revestimento. Infiltração de eosinofilos ao redor.

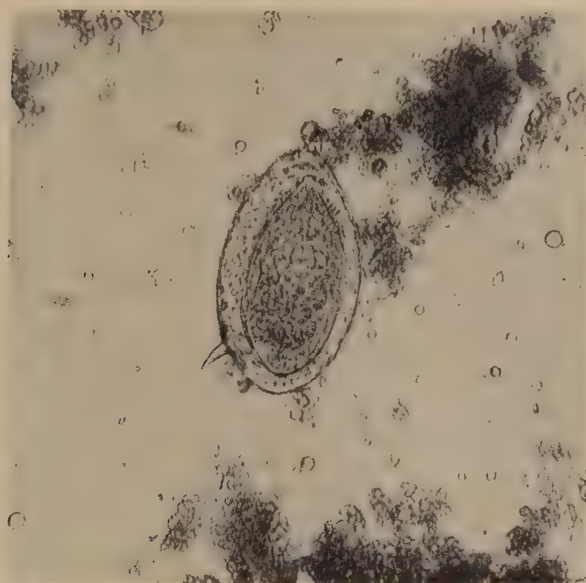
### Estampa 101

Fig. *G* — Microfoto grande aumento a seco.
Ovo de *Schistosoma* contido num capilar do corion mucoso, muito superficial.

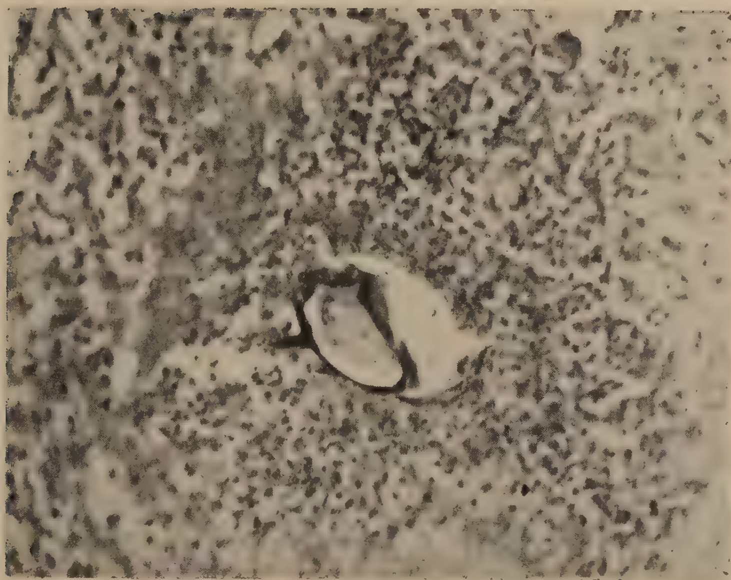
### Estampa 102

Figs. *H* e *I* — Microfotos grande augmento a seco.
Vermes machos envolvendo a femea, contidos numa veia do mesoapendice.

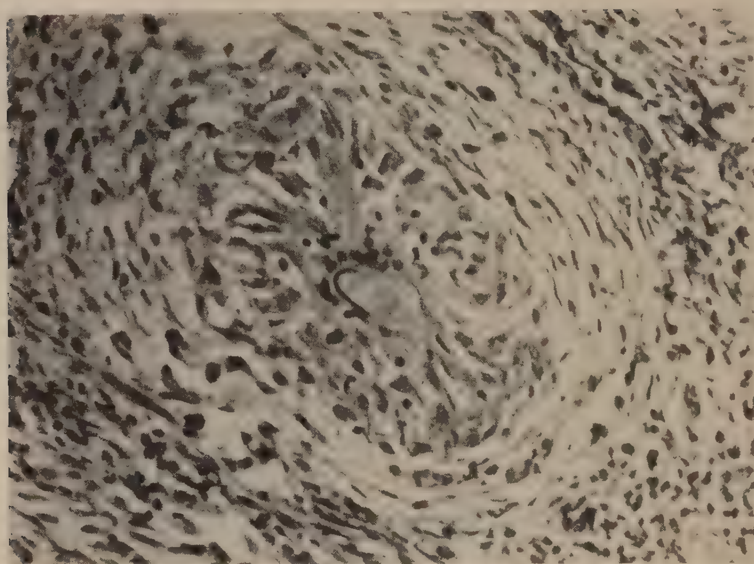




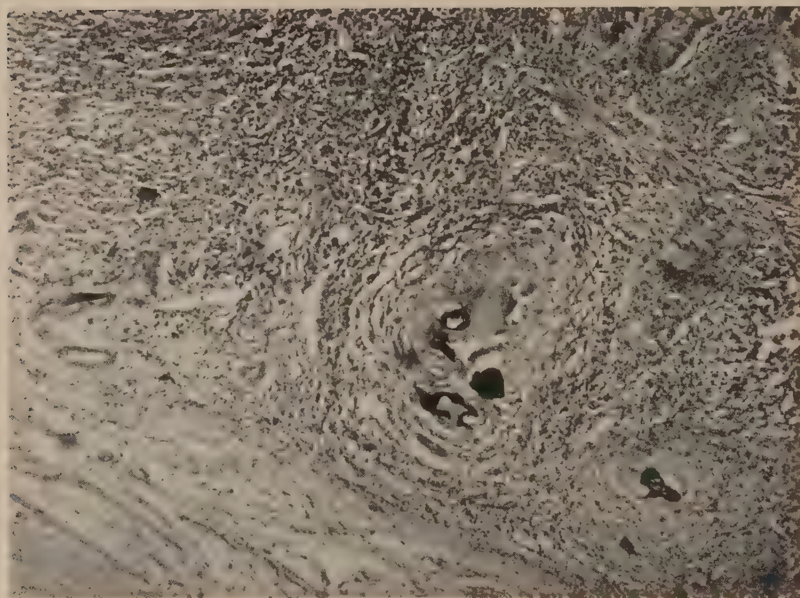
*A*



*B*



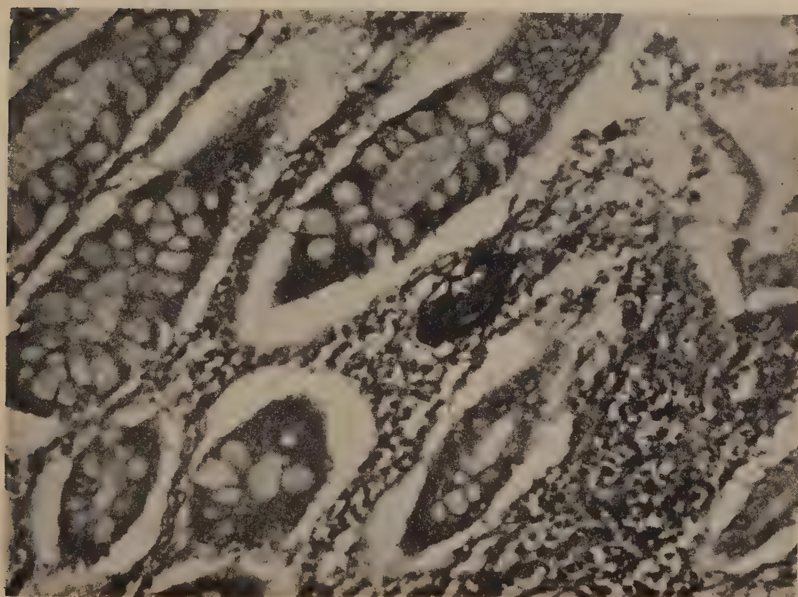
*C*



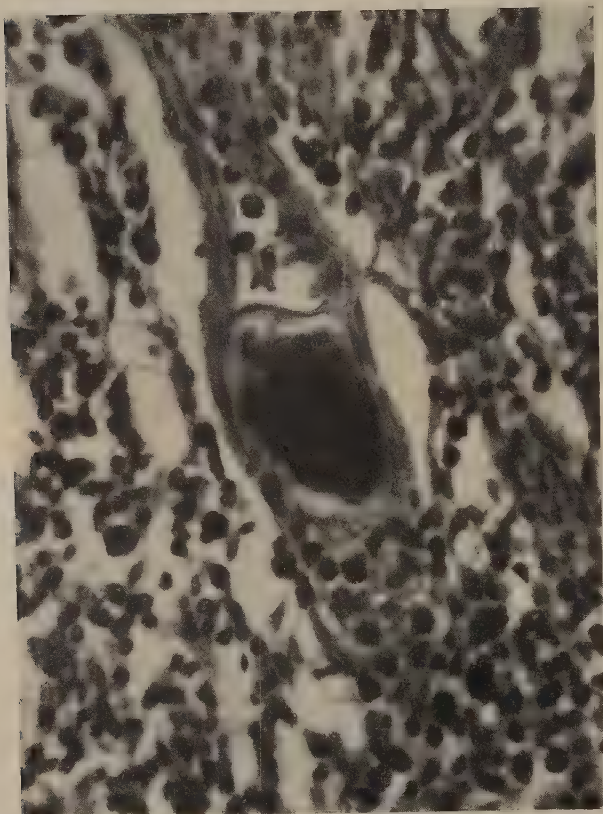
*D*



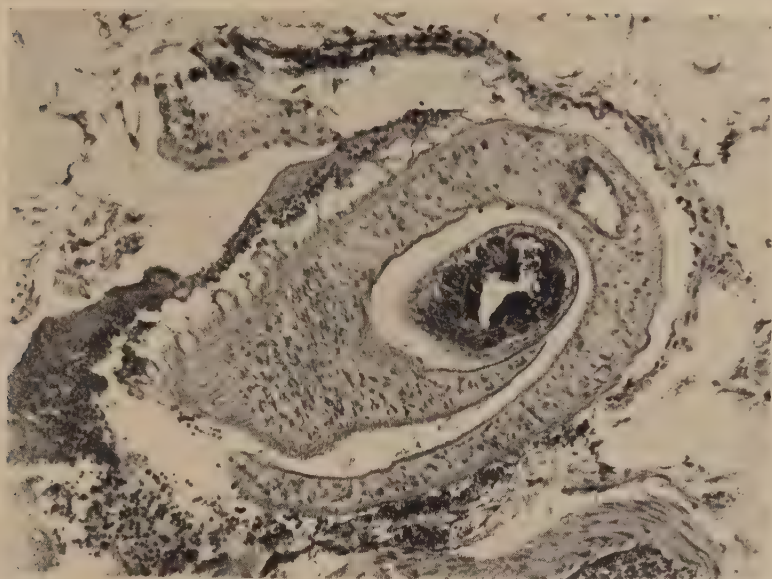
*E*



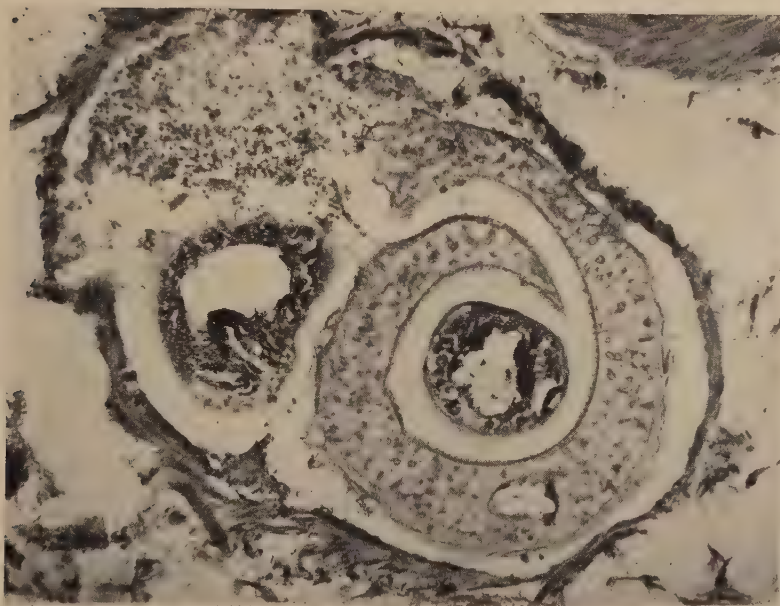
*F*



*G*



*H*



*I*

# SOBRE UMA ESPECIE DO GENERO "CLOACITREMA YAMAGUTI, 1935", PARASITO DE "NYCTANASSA VIOLACEA (L.)"

POR

Lauro Travassos

Do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

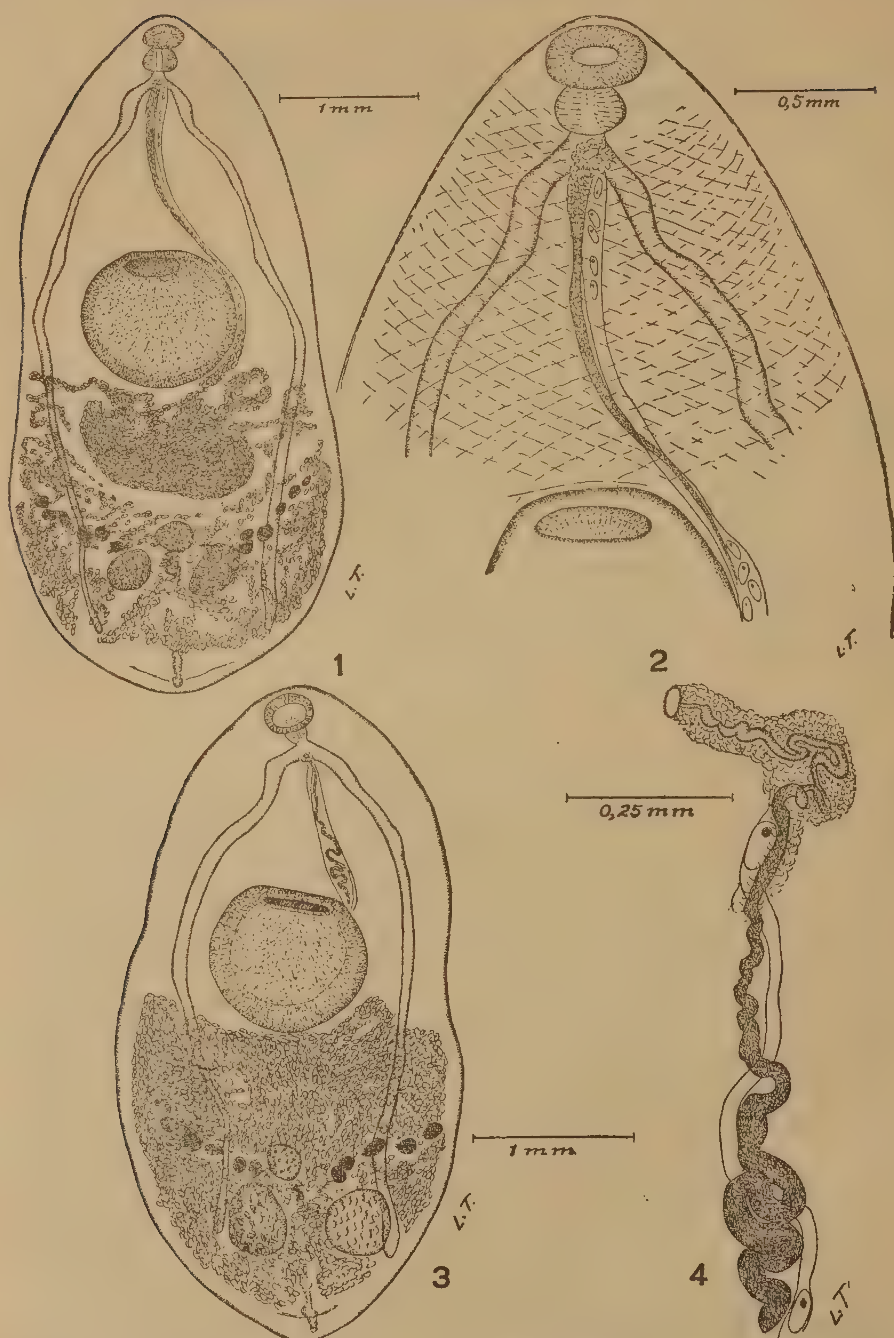
Com 4 figuras no texto

O genero *Cloacitrema* foi estabelecido para um parasito de *Bucephala clangula* (L.) no Japão. E' muito próximo de *Pygorchis* LOOSS, 1899, distinguindo-se porem deste por uma serie de bons caracteres, principalmente pela ausencia de bolsa do cirro.

Encontramos em uma ave capturada nos arredores de Manguinhos (Instituto Oswaldo Cruz) dois exemplares de uma outra especie que por alguns caracteres estabelece maior afinidade com o genero de LOOSS. Assim o acetabulo é pré-equatorial e as alças uterinas estendem-se até a area extracecal e post-testicular. Pelos restantes caracteres corresponde exatamente a *Cloacitrema.*

*Cloacitrema oswaldoi*, n. sp. (Figs. 1-4).

Comprimento 4,2 a 5,2 mm.; largura 0,13 a 0,15 mm. em exemplares fixados comprimidos. Corpo sub-elipsoide, com a maior largura post-equatorial. Cuticula lisa. Corpo fortemente musculoso com fibrilas musculares dispostas obliquamente (fig. 2). Acetabulo muito grande e medindo cerca de 1 a 1,1 mm. de diametro; fica situado logo acima do equador do corpo. Ventosa oral musculosa, alongada transversalmente, relativamente pequena e medindo cerca de 0,36 a 0,37 por 0,24 a 0,29 mm. de diametros. Faringe em seguida á ventosa oral e medindo cerca de 0,20 a 0,26 mm. de diametro. Esofago muito curto, com cerca de 0,08 mm. de comprimento. Cecos delgados e estendendo-se até perto da extremidade posterior do corpo; terminam a cerca de 0,5 mm. desta extremidade. Poro genital ao nivel do esofago. Bolsa do cirro ausente sendo a porção terminal do ductos genital masculino envolvida por celulas prostaticas (fig. 4) e havendo uma longa vesicula seminal sinuosa que se estende até a zona acetabular (figs. 2 e 4). Testiculos redondos, de cerca de 0,4 mm. de diametro. Têm as zonas coincidindo e os campos afastados; intracecais, post-ovarianos, ao nivel da terminação cecal. Ovario mediano, redondo, com cerca de 0,20 mm. de diametro, com zona em contato com a zona dos testiculos e entre os campos testiculares ou parcialmente em um deles. Glandula de MEHLIS




*Cloacitrema oswaldoi*, n. sp. Fig. 1 - tipo, total; fig. 2 - sua extremidade anterior; fig. 3 - paratipo total; fig. 4 - seu aparelho genital masculino, após forte compressão.

logo atrás do ovario, pequena, com cerca de 0,16 mm. de diametro. Vitelinos com cerca de 0,8 mm. de comprimento e constituidos por 6 foliculos relativamente grandes e dispostos linearmente do campo testicular à área extracecal. Espermateca ausente, acumulando-se os espermatozoides na porção inicial do utero em contacto com a glandula de MEHLIS. Utero inicialmente dirigido para a extremidade posterior do corpo e ultrapassando a terminação dos cecos, em seguida formando alças transversais que ocupam toda a area do corpo abaixo da zona acetabular. Somente a porção terminal do utero entra na zona do acetabulo para constituir uma longa vagina que corre paralelamente á vesicula seminal até atingir o poro genital. O canal de LAURER não poude ser observado. Ovos medindo cerca de 0,082 por 0,036 a 0,041 mm. Apresentam um miracidio provido de grande mancha ocelar. Vesicula excretora sacciforme e com diverticulos laterais.

*Habitat:* Cloaca de *Nyctanassa violacea* (L.).

Prov. Manguinhos-Rio de Janeiro.

Typo e paratipo na coleção helmintologica do Instituto Oswaldo Cruz.

Esta especie distingue-se facilmente de *C. ovatum* YAMAGUTI, 1935, pela maior diferença entre as ventosas, pelo acetabulo pré-equatorial, pelo utero extracecal post-testicular e post-acetabular. Distingue-se ainda pelo grande alongamento da vesicula seminal.

Já havia sido escrito o presente trabalho quando MC INTOSH em 1938 descreveu uma outra especie deste genero com o nome de *Cloacitrema michiganensis.*

Esta especie se distingue da que agora descrevemos principalmente pela disposição não extra-cecal das alças uterinas e pelas menores diferenças entre as ventosas e menores óvos.

Deste modo fica o genero *Cloacitrema* representado por 3 especies: *ovatum* YAMAGUTI, 1935 do Japão; *michiganensis* MC INTOSH, 1938 da N. America e *oswaldoi,* n. sp. do Brasil.

## BIBLIOGRAFIA

MC INTOSH — 1938 — A new philophthalmid trematode of the spotted sandpiper from Michigan and of the black necked stilt from Florida. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 2, 46-47.

YAMAGUTI, S. — 1935 — Studies on the Helminth fauna of Japan. Part 5. Trematodes of birds, III. *Jap. J. of Zool.*, 6, 159-186.

———o———

# LA DESENSIBILISATION CHEZ L'ANIMAL ET CHEZ L'HOMME EST-ELLE POSSIBLE?

PAR

Pasteur Vallery-Radot

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
Membre de L'Académie de Médecine

Il est une opinion classique: l'injection déchaînante, faite chez l'animal sensibilisé au sérum de cheval, le désensibilise. Nos expériences sur le lapin, montrent que cette affirmation est erronée.

Une injection déchaînante, qui produit un choc anaphylactique chez un lapin sensibilisé, le protège pendant un temps limité, n'excédant pas en général 48 heures. Au bout de ce temps, on peut obtenir un nouveau choc anaphylactique, ce qui démontre que l'état de sensibilisation persistait.

La désensibilisation du lapin existe, mais cette désensibilisation n'est pas obtenue par l'expérimentateur; elle s'effectue spontanément, par le jeu même de la nature, qui fait perdre assez rapidement à l'animal son état anaphylactique. Les expériences que nous avons pratiquées avec M. G. Mauric et Mme. A. Holtzer (Hugo) montrent que les lapins perdent leur état de sensibilisation aprés un temps assez limité: 70 jours, 95 jours au maximum aprés l'injection sensibilisante ils ne sont plus sensibilisés.

Chez l'homme, dans les allergies aux antigénes non microbiens provoquant asthme, rhume des foins, urticaire etc., les "désensibilisations" que croit obtenir le médecin avec des injections ou ingestions répétées de l'antigène nocif ne sont que des pseudo-désensibilisations: on ne désensibilise pas le sujet, on l'*accoutume* à l'antigène. En effét malgré une désensibilisation apparente, la cutiréaction ou l'intradermoréaction et la réaction de Prausnitz-Küstner restent positives: ceci est une preuve que le sujet, cliniquement "désensibilisé", n'est pas revenu, biologiquement, à l'état neutre.

D'ailleurs, la clinique elle-même vient démontrer que la désensibilisation n'est qu'apparente. Aprés avoir laissé un certain temps l'organisme dit "désensibilise" loin de l'antigène, il refait immédiatement des accidents si on le remet au contact de cet antigène: la sensibilisation n'avait donc été que masquée; les traitements par injections ou ingestions répétées de l'antigène sensibilisant n'avaient fait qu' *accoutumer* l'organisme à cet antigène.

La soi-disant "désensibilisation" humaine n'est qu'une "a c o u t u m a n c e" t e m p o r a i r e.

Des désensibilisations s'observent bien en clinique, mais ces désensibilisations sont s p o n t a n é e s. Le médecin n'a pas le pouvoir de faire perdre à un homme sensibilisé son état allergique par les méthodes dites de "désensibilisation spécifique".



# ÜBER HÄMATINÄMIE BEI MALARIA

VON

Dr. phil. et med. habil. W. Weise, Tropeninstitut, Hamburg

O. SCHUMM (1,2) hat als erster das Vorkommen von Hämatin im menschlichen Blutserum unter pathologischen Bedingungen beobachtet. Eine im langwelligen Teile des Spektrums beobachtete Absorptionsbande liess zuerst an Methämoglobin denken, verhielt sich aber gegenüber Reagentien nicht wie dieses Pigment. Durch Ammoniumpolysulfid konnte der unbekannte Serumbestandteil in Hämochromogen übergeführt und damit der Beweis erbracht werden, dass es sich um Hämatin handelte.

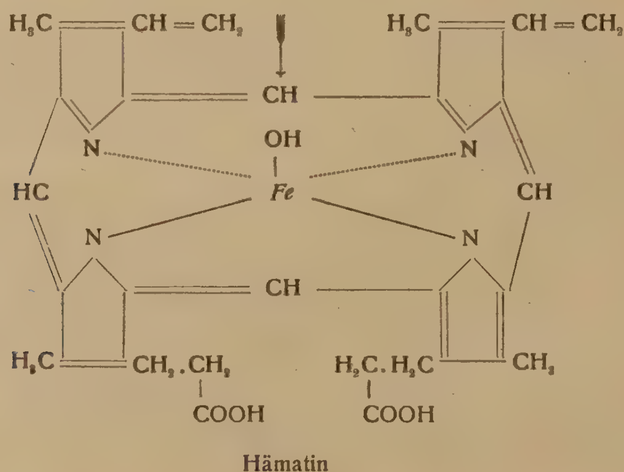
Die Verwechslung von im Serum gelösten Hämatin mit Methämoglobin geschieht auch heute noch gelegentlich. Am sichersten lässt sich die Differenzierung dadurch bewerkstelligen, dass man der Probe ein wenig Sodalösung zugibt: der durch Methämoglobin hervorgerufene Absorptionsstreifen im Orange verschwindet dann, während er im Falle des Hämatins bestehen bleibt. Diese Unterscheidung begründet sich auf die von HAUROWITZ (3) gemachte Entdeckung, dass Methämoglobin sich wie ein Indikatorfarbstoff verhält, d. h., bei Änderung der Reaktion sein Absorptionsspektrum Veränderung erleidet.

Gemeinsam mit C. HEGLER (4,5) konnte SCHUMM das Vorkommen von Hämatin im Blutserum bei einer ganzen Reihe von pathologischen Zuständen als regelmässiges Symptom nachweisen. Teils handelte es sich um Vergiftungen (Kaliumchlorat, Dinitrobenzol, Arsenwasserstoff u. a.), teils um hämolytische Prozesse (Perniziöse Anämie, Gasbrandbazillensepsis, paroxysmale Hämoglobinurie) oder um schwere Stoffwechselstörungen (akute gelbe Leberatrophie, Schwangerschaftseklampsie, kongenitale Hämatoporphyrie, schwerste Allgemeininfektionen). Von differentialdiagnostischer Bedeutung ist der Nachweis der Hämatinämie vor allem bei perniziöser Anämie und bei Extrauteringravidität geworden.

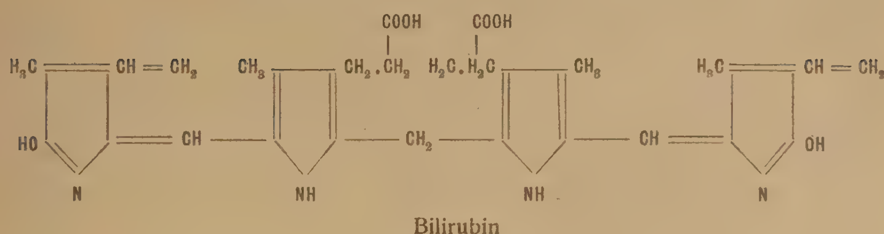
Unter den von SCHUMM und HEGLER untersuchten Seren fanden sich auch solche von 11 Malariakranken, von denen 6 Hämatin aufwiesen. Diesen Befund konnte der Verf. in vielen Fällen bestätigen. Während bei leichten Infektionen der Nachweis nicht immer gelang, war er bei den schweren in der Regel zu führen. Es braucht sich dabei nicht um einen grundsätzlichen Unterschied zu handeln: die Nachweismethode ist nicht allzu empfindlich, und selbst recht geringe Beimengungen gelösten Hämoglobins setzen die Empfindlichkeit herab.

Auf welche Quelle ist nun dieses im Blutserum gelöste Hämatin bei Malaria zurückzuführen? Es liegt sehr nahe, einen Zusammenhang mit dem endoglobulären Pigment der parasitierten Erythrozyten anzunehmen, seitdem dieses durch die Untersuchungen zahlreicher Autoren (6, 7, 8, 9) als ganz oder grösstenteils aus Hämatin bestehend erwiesen werden konnte. Besonders sorgfältig hat L. HEILMEYER (10) das Malariapigment mit Hilfe der spektrophotometrischen Methodik untersucht und ist zu dem Ergebnis gelangt, dass es als eine Verbindung des Hämatins mit einer stickstoffhaltigen Substanz anzusehen ist. Damit ist die Entstehung des Malariapigments ohne weiteres dem Verständnis nahe gebracht: den Parasiten steht als Nahrungsquelle das Hämoglobin zur Verfügung (das ja rund 1/3 der Substanz der Erythrozyten ausmacht!); sie benutzen davon den Eiweissanteil (Globin) zum Aufbau ihrer Zellsubstanz und lassen das Hämatin als Stoffwechselschlacke zurück. Durch den Vorgang der Schizogonie gelangt das Pigment in die Blutflüssigkeit. So wird es im Plasma (Serum) nachweisbar, bis es von den retikulo-endothelialen Zellen (Milz, Leber) aufgenommen worden ist.

Der Abbau des Blutfarbstoffes führt unter physiologischen Bedingungen zum Bilirubin. Vom chemischen Standpunkt ist der Übergang vom Hämatin zum Bilirubin sehr plausibel, wenn diese Umwandlung auch in vitro bisher noch nicht gelungen ist. Die nachstehenden Konstitutionsformeln lassen die nahen Beziehungen erkennen; der Pfeil zeigt die Stelle an, wo die Aufspaltung des Porphyrinsystems erfolgt:




Hämatin



Bilirubin

In der Tat wird bei Malaria das Bilirubin im Serum vermehrt gefunden (SCHACHSUWARLY, 11). Es zeigt eine verzögerte Diazoreaktion und erweist damit seinen hämolytischen Charakter. Da das Bilirubin eisenfrei ist, muss das im Hämatin komplex gebundene Eisen irgendwie im Stoffwechsel in Erscheinung treten. Es wird als Hämosiderin abgelagert, das nach den neuesten Untersuchungen aus Eisen-3-hydroxyd in lockerer Bindung an Eiweiss besteht (12). Bei Malaria findet sich Hämosiderin vor allem in der Leber, und somit ist also auch der Verbleib des Eisens klargestellt.

Nachdem es VAN STEENIS (13) gelungen war, durch den Nachweis einer vermehrten Stercobilin-Ausscheidung bei Malaria eine weitere Bestätigung dafür beizubringen, dass ein vermehrter Hämoglobin-Abbau über Bilirubin stattfindet, durfte es als erwiesen gelten, dass die Umwandlung und Ausscheidung des Malaria-Pigments auf dem skizzierten Wege stattfindet. Erneute Zweifel mussten aber entstehen, als DUESBERG (14) berichtete, dass es ihm in wiederholten Versuchen nicht gelungen sei, die Überführung injizierten Hämatins in Bilirubin nachzuweisen. Die Gallenfarbstoffbildung müsse auf direktem Wege vor sich gehen, ohne dass Hämatin als Zwischenstufe aufträte.

Wenn auch kein Anlass besteht, an der Richtigkeit der Beobachtungen DUESBERGS zu zweifeln, so bestehen doch Bedenken, seine Schlussfolgerungen ohne weiters auf das Geschehen bei Malaria zu übertragen. Man kann ihm aber insofern zustimmen, als die Befunde bei Malaria dafür sprechen, dass die Umwandlung des Hämatins für den Organismus mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist. Denn die Speicherung des Malariapigments (Hämatins) in den Zellen des Retikulo-Endothels beweist, dass der Abbau des Pigments jedenfalls einige Zeit beansprucht. Genaue Angaben darüber zu machen, ist begreiflicherweise kaum möglich: aber Beobachtungen bei Sektionen haben gezeigt, dass schon 3-4 Monate nach Ausheilung der Malaria jede Spur von Pigment verschwunden sein kann (vgl. SEYFARTH, 15). Je weiter die Erkrankung fortschreitet, um so mehr tritt eine Ablagerung von Hämosiderin in Erscheinung, deren Lokalisation allein schon die Entstehung aus abgebautem Malariapigment wahrscheinlich macht.

Zusammenfassend kann also gesagt werden: Das Malariapigment besteht im wesentlichen aus Hämatin, das auf dem Blutwege zu den Organen (Milz, Leber) befördert wird, in denen normalerweise der Abbau des Blutfarbstoffs vor sich geht. Es ist anzunehmen, dass die allmählich sich vollziehende Umwandlung des Pigments zum Gallenfarbstoff führt, während das abgespaltene Eisen in Form von Hämosiderin gespeichert wird.

* * *

Unter den Malariologen herrscht die Meinung vor, dass bei jedem Anfall viel mehr Erythrozyten zugrunde gehen, als von Parasiten befallen waren. Zählungen der roten Blutkörperchen vor und nach dem Malariaanfall, sowie Ermittlungen des Prozentsatzes der infizierten zwingen zu einer solchen Annahme. Man hat deshalb vermutet, dass in den parasitierten Erythrozyten Hämolysine entstehen, durch deren Wirkung nicht nur die befallenen sondern auch noch weitere Blutkörperchen in den Zerstörungsprozess hineingezogen werden. Der Nachweis solcher Hämolysine ist freilich trotz eifriger Bemühungen bisher nicht geglückt. MARCHOUX (16) beruft sich auf die unmittelbare Beobachtung unter dem Mikroskop: wenn die Schizonten herangereift sind, zerfallen die Erythrozyten, in denen sie sich befinden ganz plötzlich, so wie ein Stück Zucker in Wasser zergeht. Es müsse also in diesem Moment ein hämolytisches Toxin zur Wirkung kommen.

Auch vergleichend-pathologische Betrachtungen lassen das Auftreten von hämolytischen Vorgängen der gekennzeichneten Art plausibel erscheinen. In erster Linie ist hier das Schwarzwasserfieber heranzuziehen. Nachdem als erwiesen zu gelten hat, dass ein Schwarzwasserfieberanfall auftreten kann, ohne dass vorher Chinin oder ein anderes Medikament genommen wurde, liegt es nahe anzunehmen, dass es sich hier um einen Vorgang handelt, der nur in quantitativer Beziehung vom normalen Geschehen abweicht, d. h. die mit der Malariaerkrankung regelmässig verbundenen hämolytischen Vorgänge erfahren plötzlich eine enorme Steigerung. Bei der *Plasmodium-knowlesi*-Infektion der Affen *(Macacus rhesus)* sind diese hämolytischen Prozesse so ausgeprägt, dass es in der Regel zu Hämoglobinurie kommt.

Hämolytische Vorgänge der gekennzeichneten Art müssen zum Auftreten von freiem, d. h. also im Plasma (Serum) gelöstem Hämoglobin führen. Hämoglobinämie geringen Grades ist aber schwer nachweisbar. Das frei werdende Hämoglobin wird sehr rasch abgefangen oder ausgeschieden, so dass seine Konzentration im Serum sehr niedrig ist. So kommt es, dass sogar beim Schwarzwasserfieber das Vorhan-

densein einer Hämoglobinämie lange umstritten war und man deshalb zu der Hypothese Zuflucht nahm, dass die Hämolyse in der Niere stattfände. In erster Linie war es N. H. FAIRLEY (17) der das regelmässige Auftreten gelösten Blutfarbstoffs im Serum beim Schwarzwasserfieberanfall nachwies. In jüngster Zeit ist es nun E. M. VOIGT und C. VOIGT (18) gelungen, mit Hilfe der von FAIRLEY und BROMFIELD (19) verbesserten Technik in einem Teil der untersuchten Fälle von Malaria tropica (4 und 17) gelöstes Hämoglobin im Plasma aufzufinden. Dadurch hat die auf Grund der Zählergebnisse gemachte Annahme hämolytischer Prozesse eine wesentliche Stütze erhalten.

Es ergibt sich damit eine zweite Quelle für das Auftreten von Hämatin im Blutserum bei Malaria, nämlich seine Entstehung aus gelöstem Hämoglobin. Dieser Umwandlungsprozess ist durch die Arbeiten von N. HAMILTON FAIRLEY aufgedeckt worden. FAIRLEY und BROMFIELD (20) berichteten 1934 über ein neues, dem Methämoglobin verwandtes Pigment, das sie im Serum eines Schwarzwasserfieberkranken gefunden hatten. Sie konnten dann in Mazedonien in der Mehrzahl der daraufhin untersuchten Schwarzwasserfieberfälle (12 von 14) diesen Befund bestätigen (21). Das chemische und spektroskopische Verhalten des neuen Farbstoffs stimmte im wesentlichen mit dem des (im Serum gelösten) Hämatins überein. Nur gegenüber Ammoniumsulfid erwies es sich als beständig.

Soweit wie geschildert, brachten die Ereignisse FAIRLEYs nichts wesentlich Neues: das Auftreten von Hämatin bei Schwarzwasserfieber war zu erwarten, und die geringen Abweichungen im Verhalten konnten auf einem Irrtum beruhen. Erhöhtes Interesse mussten aber seine Arbeiten in dem Augenblick erwecken, als er mitteilte, dass es ihm auch *in vitro* gelungen sei, das neue Pigment zu erzeugen, und zwar einfach dadurch, dass in Plasma oder Serum gelöstes Hämoglobin 24-48 Stunden im Brutschrank gehalten wurde (22). Im Organismus solle es immer dann entstehen, wenn durch intravaskuläre Hämolyse im Plasma gelöstes Hämoglobin auftritt.

Die Nachprüfung dieser Befunde, über die an anderer Stelle ausführlich berichtet werden soll, erbrachte die Bestätigung dafür, dass in der Tat in vitro ein Pigment der beschriebenen Art entsteht. Es erwies sich aber in allen seinen Eigenschaften als identisch mit in Serum gelöstem Hämatin. Hämoglobin wird also, wenn es im Blutplasma gelöst ist, leicht zu Hämatin abgebaut, und die schon vor langer Zeit von SCHUMM, HEGLER (l. c.) sowie auch von BINGOLD (23) bei verschiedenen pathologischen Zuständen beobachtete Hämatinämie verdankt sicher, wenigstens in einem Teil dieser Fälle, einem solchen Vorgang ihre Entstehung.

FAIRLEY (24) ist nun in jüngster Zeit zu der Überzeugung gelangt, dass das von ihm vorher als "Pseudo-Methämoglobin" bezeichnete Pigment in naher Verwandtschaft zum Hämatin stehen müsse. Er konnte es nämlich synthetisch gewinnen aus Hämatin und Serum-Albumin. Auf Grund dieses Befundes hat er es in Methämalbumin" umbenannt.

Auf die Tatsache, dass im Blutserum gelöstes Hämatin eine Bindung mit den Eiweisskörpern eingeht, hat bereits HEILMEYER (10) hingewiesen. Das Ergebnis seiner sorgfältigen spektrophotometrischen Untersuchungen fasst er folgendermassen zusammen: "Im Serum haben wir also nicht das Spektrum des alkalischen Hämatins sondern eines Eiweiss-Hämatins vor uns". FAIRLEY darf es also als sein Verdienst buchen, dass er die Natur dieses Eiweisskörpers aufgeklärt hat. Man kann freilich darüber streiten, ob es angebracht ist, diese lockere Hämatin-Eiweiss-Verbindung mit einem besonderen Namen zu belegen.

Auf Grund der vorgebrachten Tatsachen möchte der Verf. abschliessend folgende Auffassung bezüglich der Hämatinämie bei Malaria vertreten: Das in schweren Fällen von Malaria (besonders Mal. tropica) im Blutserum nachweisbare Hämatin hat seinen Ursprung im endoglobulären Pigment der befallenen Erythrozyten. Beim Schwarzwasserfieber verdankt es seine Entstehung zur Hauptsache dem Abbau des im Plasma gelösten Hämoglobins.

## LITERATUR


1 — O. SCHUMM — Zeitschr. f. physiol. Chem. 80: 1 (1912).
2 — O. SCHUMM — Ibid. 87: 171 (1913).
3 — F. HAUROWITZ — Ibid. 137: 124 (1924).
4 — O. SCHUMM u. C. HEGLER — Vortr. Biol. Abt. Ärztl. Vereins zu Hamburg am 29-12 (1912).
5 — C. HEGLER, Münch. Med. Woch. 1912: 2924.
6 — C. SEYFARTH — Verh. Dtsch. Pathol. Ges. Jena 1921: 303.
7 — E. MAYER — Virchows Arch. 240: 117 (1922).
8 — J. A. SINTON u. B. N. GHOSH — Records Malaria Survey India, 4: 15, 43, 205 (1934).
9 — B. N. GHOSH — Ibid. 4: 321 (1934).
10 — L. HEILMEYER — Medizinische Spektrophotometrie, Jena 1933, S. 135.
11 — M. SCHACHSUWARLY — Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. 31: 399 (1927).
12 — M. BEHRENS u. TH. ASHER — Zeitschr. f. physiol. Chem. 220: 97 (1933).
13 — P. B. VAN STEENIS — Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indie 68: 401 (1928).
14 — R. DUESBERG — Arch. exp. Pathol. 174: 305 (1934).
15 — C. SEYFARTH in: HENKE-LUBARSCH — Handb. d. spez. Pathol. Anatom. u. Histol. Bd. I, 1. Teil, S. 223.
16 — MARCHOUX, Paludisme, Paris 1926, S. 162.
17 — N. H. FAIRLEY u. R. J. BROMFIELD — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. 28: 141 (1934).
18 — E. M. VOIGT u. C. VOIGT — Ibid. 31: 539 (1938).
19 — N. H. FAIRLEY u. R. J. BROMFIELD — Ibid. 27: 289 (1933).
20 — FAIRLEY u. BROMFIELD — Ibid. 28: 307 (1934).
21 — FAIRLEY — Nature (Lond.) 139: 588 (1937).
22 — FAIRLEY u. BROMFIELD — Trans. Roy Soc. Trop. Med. 31: 139 (1937).
23 — K. BINGOLD — Klin. Woch. 1926: 1550.
24 — FAIRLEY — Nature (Lond.) 142: 1156 (1938).


———o———

# ÜBER DIE RICKETTSIEN DES FÜNFTAGEFIEBERS

VON

Prof. Dr. H. Werner, Berlin-Steglitz

Die Fünftagefieberforschung ist mit dem Namen ROCHA-LIMAS eng verknüpft. Nachdem im Januar 1916 das Fieber von WERNER und HIS als neues Krankheitsbild erkannt und proklamiert war, wurde zunächst durch Blutübertragungen (WERNER und BENZLER, MC. NEE, RENSHAW und BRUNT) von Mensch zu Mensch der infektiöse Charakter der Krankheit mit Anwesenheit des Erregers im Blute festgestellt. Später - November 1916 - erfolgte von WERNER und BENZLER die erste Übertragung von Mensch zu Mensch durch den Biss der Laus. Es war damals durch die Forschungen PROWAZEKS und ROCHA-LIMAS die ätiologische Bedeutung der Rickettsien in der Laus für das Fleckfieber festgestellt worden. So lag es nahe nach ähnlichen Befunden für das Fünftagefieber zu suchen, für welches aus epidemiologischen hygienischen Gründen von den Entdeckern von Anfang an Laeuse als Überträger vermutet worden waren. TOEPFER war der erste, der im März 1916 Rickettsienbefunde in der Laus nach Saugen von Fünftagefieberblut feststellte. Dabei gelang diesem Autor auch die Feststellung, dass diese Rickettsien erst am 4. bis 5. Tage nach dem Saugen von Fünftagefieberkranken in der Laus auftraten. Hier setzten die Forschungen ROCHA-LIMAS ein, dem es besonders wichtig erschien, Unterschiede zu finden zwischen den Rickettsien des Fleckfiebers und denen der Quintana. Er legte dabei grösseren Wert auf die Sicherstellung der Befunde im Laeusemagenausstrichpräparat durch entsprechende Befunde in den Gewebsschnitten der Laus. Er konnte auf diese Weise - unterstützt durch seine Mitarbeiterin H. SIKORA - die grundlegend wichtige Feststellung machen, dass die Quintanarickettsien nicht in die Zellen des Laeusedarms eindringen, wie es die Fleckfieberrickettsien tun, sondern auf der Oberfläche dieser Zellen einen Palisadensaum bilden, ohne in das Innere der Zellen einzudringen. Diese Feststellung führte zu einer sicheren Abgrenzung der beiden Rickettsienarten und stellte damit die weitere Forschung auf einen sicheren Boden. Auch die ätiologische Bedeutung der Quintanarickettsien für das Fünftagefieber, die durch die Befunde von TOEPFER und anderen (JUNGMANN, KASBINSKI, WERNER) bereits wahrscheinlich gemacht war, wurde durch die Untersuchungen ROCHA-LIMAS sichergestellt. ROCHA-LIMA hatte von "70 Versuchen an Patienten, bei welchen MUNK die Diagnose Fünftagefieber gestellt hatte, 50 mal ein positives Resultat, d. h. den Befund von Rickettsien im Läusemagen, 11 blieben negativ und 6 wurden als nicht vollkommen sicher

ausgeschaltet. Von den 53 Kontrolluntersuchungen blieben 26 negativ, in 6 jedoch infizierten sich die Läuse mit Rickettsien. Die Kontrollen wurden an Kranken angesetzt, die sicher kein Fünftagefieber hatten".

Damit war die Erregerschaft der Rickettsien in hohem Masse wahrscheinlich geworden.

ROCHA-LIMAS Feststellungen über die Rickettsien des Fünftagefiebers bezogen sich auch auf die Dauer des Verweilens dieser Krankheitserreger im Blute der Rekonvaleszenten nach Abklingen des Fiebers und ergaben eine hohe Tenacität des Erregers im Menschenblut über die eigentliche Fieberzeit hinaus. Die Ergebnisse ROCHA-LIMAS sind später in weitgehendem Masse von der englischen und amerikanischen Kommission zum Studium des Fünftagefiebers bestätigt worden.

Nach dem Weltkriege ist das Fieber in fast allen Teilen der Welt verschwunden; so spontan und scheinbar unvermittelt wie es entstanden war ist das Fieber wieder der Beobachtung entrückt. So darf es nicht wundernehmen, dass die Forschung seit dem Weltkrieg fast völlig zum Stillstande gekommen ist. Immerhin sind wir nicht ganz ohne spätere Nachrichten geblieben. Aus Polen und aus Japan liegen noch spärliche Nachrichten vor über das Vorkommen des Fiebers, verbunden mit wissenschaftlichen Feststellungen, die einen nicht unwesentlichen Fortschritt gegenüber dem Stande der Kriegszeit und der ersten Nachkriegszeit darstellen.

In Lemberg in Polen wurde im Laboratorium WEIGL eine Epidemie von Quintana beobachtet, beschrieben von HENRY MOSING, und zwar bei 18 Laboratoriumsarbeitern des Weigl'schen Institutes, welche mit Herstellung des Weigl'schen Fleckfieberimpfstoffes beschäftigt waren. Alle diese 18 Erkrankten — der Gesamtbestand dieser Arbeiter betrug 40 Köpfe — waren zuvor mit dem WEIGL'schen Fleckfieberimpfstoff geimpft, drei hatten Fleckfieber selbst überstanden, und jeder von ihnen hatte seit geraumer Zeit eine grosse Anzahl von Laeusen - gegen 10000 Stück täglich - am eigenen Körper gefüttert. Die Fieberkurven entsprachen nicht der des Fleckfiebers, sondern der des Fünftagefiebers mit regelmässig im typischen Turnus wiederkehrenden Paroxysmen. Das Serum der Kranken und Rekonvaleszenten agglutinierte nicht den Bazillus *Proteus X 19*, auch nicht die *Rickettsia prowazeki*, wohl aber die Rickettsie, welche von dem Blute der Erkrankten in den Läusen gezüchtet war. Diese Züchtung gelang unschwer in allen Fällen; sie ergab deutlich auf extrazellulares Wachstum im Läusedarm beschränkte Wachsform. Die klinischen Erscheinungen der Krankheit entsprechen denen des Fünftagefiebers. Ob man bei dieser weitgehenden Übereinstimmung von einer neuen Krankheit sprechen darf, wie MOSING es will, und eine Weigl'sche Krankheit mit *Rickettsia Weigli*

als Erreger als Nova aufstellen soll, oder nicht vielmehr echte Quintana annehmen soll, lasse ich dahingestellt. Von hohem Interesse sind nun die nosologischen Erwägungen, welche sich mit dieser Epidemie ergeben. Zunächst das erste Entstehen einer Epidemie bei einem wissenschaftlich auf's Genaueste beobachteten Krankenmaterial, das klinisch und bakteriologisch ständiger Kontrolle unterworfen war. Die weitere Beobachtung der Lemberger Epidemie hat, wie WEIGL und HERZIG mitteilen, ergeben, dass die Pathogenität allmählig geringer wurde und schliesslich ganz erlosch. Die klinischen Symptome traten immer weniger hervor und blieben schliesslich ganz aus, obgleich noch Rickettsien im Blute durch Läuseinfektion nachgewiesen werden konnten; es handelte sich demnach schliesslich nur noch um eine Rickettsiaemia Weigli, bis endlich auch die Rickettsien im Blute nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Das theoretisch Interessante dabei ist die Feststellung, dass die Krankheitserreger ihre Menschenpathogenität allmählich verloren und des Weiteren als harmlose Saprophyten im Blute kreisten, um schliesslich ganz zu verschwinden. Die umgekehrte Entwicklung, nämlich, dass für Menschen unschuldige Krankheitserreger der Laus pathogen werden können, wird von der Mitarbeiterin WEIGL's (A. HERZIG) ins Auge gefasst. Beide Entwicklungen, die man als ein Wechselspiel zwischen Pathogenität und Apathogenität bezeichnen könnte, finden Analogien bei vielen anderen Infektionskrankheiten. Es sei in diesem Zusammenhang erinnert an die Bazillenträger bei Typhus, der Diphterie, der Genickstarre, bei Wurminfektionen der verschiedensten Art, bei Malaria und anderen Infektionen.

Eine weitere im Zusammenhang mit der Lemberger Epidemie aufgeworfenen Frage (A. HERZIG) ist die nach dem "Wirt" der Rickettsien, d. h. ob der Mensch oder die Laus der echte Wirt der Rickettsien sei. HERZIG sieht in dem Blute des gesunden Menschen den Geburtsort der Rickettsien.

Nun entspricht es bei Infektionen mit Wirtswechsel des Erregers zwischen Warmblüter und Kaltblüter der herrschenden Auffassung, den Organismus als eigentlichen Wirt anzusprechen, in welchem sich Geschlechtsvorgänge beim Erreger nachweisen lassen (Malaria-Mücke; Trypanosoma-Fliege usw.)

Es finden sich aber beim Fünftagefieber ebenso wie beim Fleckfieber Anzeichen von Geschlechtsvorgängen nur in der Laus (Infektionität erst vom 3. — 4. Tage nach dem Blutsaugen an). Es dürfte deshalb richtiger sein, die Laus als das eigentliche Wirtstier der Rickettsieninfektion anzusehen. Ob als Pseudowirt neben dem Menschen noch andere Warmblüter in Frage kommen, wie

Ratten bezw. Mäuse, dürfte für das Fünftagefieber wahrscheinlich sein.

Die Lemberger Epidemie mit ihrem Laboratoriumscharakter, in einem Fleckfiebermilieu entstanden, legt natürlich auch die Frage nahe, ob nicht etwa eine anfängliche Fleckfieberinfektion unter dem Einfluss der präventiven Vaccination, also einer abschwächenden Beeinflussung in eine der Quintana gleichende Infektion übergegangen sei, wie wir aus dem Kriege abortive Typhusfälle kennen, die ihre Abschwächung voraufgegangener Vaccination verdankten. Diese Folgerung ist meines Erachtens abzulehnen mit Rücksicht auf die oben erwähnten durchaus unterscheidenden Ergebnisse der serologischen Prüfung. Man hätte bei dieser Deutung einen positiven Ausfall der Agglutinationsprobe mit *Rickettsia prowazeki* erwarten müssen, die, wie wir sahen, negativ war. Auch das Verhalten der Erreger gegenüber den Darmzellen der Laus spricht gegen diese Deutung.

Ausser den bemerkenswerten Mitteilungen der Weigl'schen Schule über die Lemberger Epidemie verdanken wir japanischen Forschern, in Sonderheit NORIO OGATA, weitere Mitteilungen über das Vorkommen von Quintana nach dem Weltkriege und weitere Fortschritte in der Erforschung der Krankheit. NORIO OGATA gelang es, das Virus des Fünftagefiebers im Kaninchenhoden zu züchten. Er ging dabei so vor, wie er bei dem von ihm entdeckten Erreger der Tsutsugamushi-Krankheit verfahren war. Er verimpfte das Quintanamaterial (Blut) auf Kaninchenhoden und übertrug von diesem ersten Kaninchen nach einiger Zeit auf ein anderes Kaninchen, auch wenn beim ersten Versuchstier keinerlei Veränderungen am Hoden festzustellen waren. Diese Kaninchenhodenübertragungen wurden dann noch mehrfach wiederholt bis schliesslich klinisch wahrnehmbare Veränderungen an den Hoden sichtbar wurden (Schwellung und Rötung). Das dann den Impfstellen entnommene Gewebsmaterial ergab Reinkulturen von Rickettsien, die dann auf Kaninchen weitergezüchtet wurden und mit dem Menschen mit Fünftagefieber infiziert werden konnten.

Neben der Weigl'schen Laeusezucht stellt diese Ogataimpfung die bisher sichersteForm der Züchtung des Erregers der Fünftagefiebererkrankung dar.

Dass daneben auch lebende Zellkultur für die Erregerzüchtung beim Fünftagefieber als aussichtsreiche Methode in Betracht kommt, dürfte nach den bisher bekannt gewordenen Erfolgen dieser Kultivierung bei anderen Virusarten selbstverständlich sein.

Auch die therapeutische Verwendung des Fünftagefiebers hat N. OGATA in der Praxis versucht. Es handelt sich um therapeutisch

gegen Paralyse Tabes und Gehirnsyphilis gerichtete Quintanaimpfung, ein Verfahren, das vom Verf. erstmalig 1927 (2) vorgeschlagen, aber damals mangels geeigneten Materials nicht erprobt werden konnte. OGATA hat diese Impfung an einer Reihe von Paralysefällen praktisch erprobt und guten Erfolg gesehen. Für die Quintanaverwendung zur Paralysebehandlung anstatt der Malaria spricht:

1) die völlige Gefahrfreiheit der Quintanaimpfung gegenüber der Malaria, deren Gefahren bei artifizieller Übertragung ja bekannt sind.
2) Das Wegfallen der Notwendigkeit, die Impfkrankheit durch spezifische Behandlung zu heilen (Chinin oder Salvarsan, Atebrin, Plasmochin).

Der Umstand, dass der Quintanaerreger noch lange nach dem Erlöschen der klinischen Erscheinungen im Blute der Patienten nachzuweisen ist, dürfte keinen Hinderungsgrund abgeben gegen die Verwendung der Quintana zur Paralyseimpfung, da Weiterverbreitungsgefahr der Quintana bei vorsichtigem Umgang mit dem Überträgermaterial ohne grössere Schwierigkeit vermieden werden kann.

## LITERATUR

1 — MOSING, HENRY — Arch. Inst. Pasteur Afr. N. Tunis. T. XXV 1936 Bd. ¾ S 337-387.
2 — WERNER H. — Festschrift f. Nocht. Hamburg. Universität, Abh. Auslandskunde Bd. 26, Reihe D. Bd. 2.
3 — OGATA, NORIO — Zentralblatt f. Bact. Bd. 120 1936.
4 — OGATA, NORIO — Wiener kl. Wo. 1936.
5 — KATSURADA u. YOSCHIDO — Über 2 Fälle v. sog. Fünftagefieber. Abh. a. d. Gebiet der Auslandskunde. Hamburg. Universität Bd. 26 Reihe B. Bd. 2. (Festschrift für Nocht).
Ferner japanische Literatur von
T. KARAI, INADA, MORIYA, YOSHINO, YAGI, SHINDO und OGATA in japanischer Sprache.

———o———

Vol. 11 — Art. 63 1940

# COCCIDIOS DAS AVES NA UNIÃO SOVIETICA

PELO

Prof. Dr. V. L. Yakimoff

Do Instituto Veterinario de Leningrado

Com as estampas 103-104

A historia dos coccidios e das coccidioses nos animais começou no 7.º decenio do seculo passado. Após uma tregua, o assunto reapareceu na literatura cientifica com o termino da guerra mundial. Atualmente inumeros trabalhos aparecem sobre este tema.

Entre os países que se ocupam com o estudo desta questão, a União Sovietica figura em logar de destaque. Desde 1925 até agora a cadeira por nós regida, de parasitologia, do Instituto de Veterinaria de Leningrado, descreveu mais de 90 novos coccidios nos animais domesticos e selvagens. No presente artigo ocupar-nos-emos dos coccidios das aves domesticas e selvagens.

Os primeiros coccidios de ave foram encontrados pelo pesquisador RIVOLTA em 1869, na galinha. Em 1870 EIMER tambem achou coccidios nessa ave. RIVOLTA e SILVESTRINI (1873) descreveram coccidios na galinha, o que, ao mesmo tempo, foi feito por ARLOIGNE e TRIPIER. Sob a denominação de *Gregarina avium intestinalis* RIVOLTA, em 1878, descreveu coccidios que "encontrou agrupados, em galinhas domesticas, no melro, no corvo etc". RIVOLTA e DELPRATO, em 1880, descreveram coccidios de passaros. HARZ, em 1887, descreveu coccidios na galinha, sob a denominação de *Coccidium rivolta*. PODVISSOTSKI, em 1890, descreveu coccidios em ovos de galinha (com o que não concorda SCHUBERG (1895) que considera o parasita descrito como ovos de distomo). Em 1891 REILLET e LUCET denominaram os coccidios de galinha *Coccidium tenellum*, denominação que passou a ser atribuida por muitos autores (RIVOLTA, SILVESTRINI, MEGNIN, ZUERN e outros) aos coccidios do pombo, ganso e pato. Porem, no mesmo ano (1891), REILLET e LUCET descreveram a coccidiose dos gansos, onde encontraram um coccidio novo nos rins, que denominaram *Coccidium truncatum*. LABBÉ, em 1893, descreveu coccidios em muitas aves e, nalgumas delas, denominou-os *Coccidium roskoviense*. O mesmo autor, no mesmo ano, substituiu o nome de *Gregarina* ou *Psorospermium avium*, dado por RIVOLTA aos coccidios dos passaros, pelo de *Diplospora lacazei* e, em 1896, denominou *Coccidium pfeifferi* aos coccidios do pombo.

No começo do seculo atual diminuiu o interesse pelo estudo dos coccidios das aves, interesse que ressurgiu depois da guerra.

Na União Sovietica, os primeiros coccidios foram encontrados na galinha por YAKIMOFF em 1925, na região de Leningrado. Depois esses protozoarios foram encontrados em dezenas de aves, entre outras, gansos, perús, pombos, faizões, pêgas, gralhas, pardais e andorinhas.

Possuimos já abundante material sobre coccidios. Apezar disso, este capitulo da protozoologia é ainda rudimentar.

Antes de tudo, diremos que ainda reina confusão, embora menor, quanto aos generos e especies de coccidios das aves. Até 1929, por exemplo, os coccidios de todas as aves domesticas e mesmo de algumas selvagens (faizão) foram identificados ao da galinha *(Eimeria tenella)*. E' verdade que ultimamente a questão começou a se esclarecer, embora de modo incompleto.

No presente artigo descrevemos em primeiro lugar as especies encontradas nas aves: 1) domesticas, 2) de caça e 3) selvagens. Os coccidios observados nessas aves pertencem aos generos *Eimeria, Isospora* e *Caryospora.*

1) Aves domesticas.

a) Galinhas

Dissemos acima que REILLET e LUCET descreveram em 1891 coccidios encontrados na galinha e os denominaram *Coccidium tenella* (agora *Eimeria tenella*). Supunha-se naquela epoca que existisse uma só especie de coccidios na galinha.

Os coccidios da galinha, antes de REILLET e LUCET, foram descritos como *Coccidium avium.* RIVOLTA e SILVESTRINI (1875) descreveram sob essa denominação um parasita de 40-60 μ encontrados na submucosa com envoltorio delgado e homogeneo, cheio de corpusculos fusiformes. TYZZER (1929) diz que, lendo-se atentamente essa descrição, verifica-se que nela não se encontra a palavra *avium.* As observações dos autores italianos foram feitas quando pouco se sabia do ciclo de desenvolvimento dos coccidios e da etiologia, em geral, das doenças infeciosas. Por isso, para aqueles autores, era natural considerar como coccidiose as doenças das aves, que se lhe assemelhavam. A denominação *avium,* porem, foi mais tarde usada (HADLEY, 1908, 1909). LABBÉ (1899) cita RIVOLTA, com a data de 1877, como autor da denominação *Gregarina avium intestinalis.* Deve haver erro de data, pois o trabalho citado foi publicado em 1878. REICHENOW (1921) confirma que RIVOLTA empregou em 1878 a denominação *Psorospermium avium* para os coccidios do genero *Isospora* e que a denominação *Coccidium tenella,* usada para os coccidios da galinha, foi dada pela primeira vez por REILLET e LUCET (1891), tendo-a REILLET substituido em 1913 por *Eimeria tenella.* HARZ, em 1886, usou ainda a denominação *Coccidium*

*rivolta*, denominação que foi dada por GRASSI, em 1879, a um coccidio do gato, do genero *Isospora*. Mais tarde foram feitas varias confusões, principalmente na descrição da coccidiose das galinhas. Assim, HADLEY considera os coccidios como causa da diarréia branca das galinhas e da "black head" dos perús e afirma que viu coccidios no figado, no esofago, nos canais biliares e em nodulos do pulmão. Em 1911 e 1916 este autor negou fosse um coccidio a causa da "black head". Também ECKHARDT (1903) diz ter encontrado no figado pequenos nodulos cuja origem atribuiu a coccidios.

O protozoologista americano TYZZER, em 1929, constatou em suas pesquizas a existencia de quatro coccidios da galinha: *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. mitis*. Todos esses coccidios têm localisação diversa no intestino. Assim, a *E. tenella* acha-se principalmente nos cecos e, ás vezes, na porção media do intestino; a *E. acervulina* e a *E. mitis* encontram-se, principalmente, na primeira porção do intestino, ás vezes, na porção media e, de inicio, nos cecos; a *E. maxima* existe quasi sempre na porção media do intestino e, ás vezes, no primeiro segmento. As formas e as dimensões desses coccidios tambem são diferentes. Assim, a *E. tenella* é oval e tem 19,6 — 26,1 X 16,3 — 22,1 μ, em media, 22,6 X 19,0 μ; a *E. acervulina* é oblonga e tem 17,7-20,2 X 13,7-16,3 μ, em media, 12,5 X 14,3 μ; a *E. maxima* apresenta a mesma forma e tem 21,4-42,5 X 16,5-29,8 μ, em media, 29,3 X 22,6 μ; a *E. mitis* é redonda e tem 14,3-19,6 X 13,0-17,0 μ, em media, 16,2 X 15,5 μ.

A infecção cruzada indicou que todos esses coccidios são especies bem definidas: a doença produzida por um deles não imunisa para outro.

Alem destes quatro coccidios, JOHNSTON (1930) nos EE. UU. descreveu dois novos — *E. praecox* e *E. nocatrix*. Embora TYZZER e colaboradores (1932) considerem aceitaveis estas duas especies, é todavia prematuro reconhece-las como distintas.

Os quatro parasitos acima descritos por TYZZER foram encontrados na U.R.S.S. por YAKIMOFF (1925) na região de Leningrado, por YAKIMOFF, GUCEV e RASTEGAEVA (1933) em Uzbekistan, Azerbaidjan e Russia Branca, e por SADOVSKI (1933), no Caucaso Norte. Esses coccidios encontram-se em outras regiões da U.R.S.S. Alem disso, YAKIMOFF (1935) encontrou coccidios em material de galinha enviado do Brasil.

De todos os coccidios acima citados, TYZZER (1929) considera a *E. tenella* como a mais patogenica. Esta especie produz uma forma aguda de coccidiose caracterisada por hemorragias abundantes e frequentes nos cecos e em outras regiões da ultima porção do trato intes-

tinal. O elevado poder patogenico deste coccidio é devido á abundante multiplicação das formas assexuadas, que adquirem grandes dimensões. Estas formas lesam gravemente as celulas epiteliais, produzindo graves hemorragias nas mucosas dos cecos.

Os demais sintomas da infestação coincidem com o aparecimento das primeiras hemorragias. As galinhas conservam-se em relativo repouso, não sáem do poleiro, comem pouco, suas penas perdem o brilho. No decorrer da hemorragia as mucosas empalidecem.

As formas cronicas da doença são causadas pela *E. acervulina.* Pouco se sabe do valor patogenico da *E. maxima.* A patogenicidade da *E. mitis* é tão insignificante que, praticamente, pode ser considerada inocua, não produzindo fenomenos patologicos apreciaveis. A *E. nocatrix* causa uma doença nos pintos, em geral mortal. A *E. praecox* não parece patogenica.

COLE e HADLEY (1910) atribuiram aos pardais a fonte de infestação das galinhas, mas TH. SMITH e SMILLIE (1917) provaram não ser isso possivel porque os coccidios dos pardais são do genero *Isospora* e o das galinhas do genero *Eimeria.* Em 1931, PROKHOROV sustentou de novo a possibilidade da infestação pelos pardais, o que julgamos inaceitavel. Não é verdadeira a afirmação de PROKHOROV de que YAKIMOFF encontrara 100% de pombos infestados com coccidios de galinha. Ao contrario, YAKIMOFF e IVANOVA-GOBZEM (1931) provaram com ensaios que, embora nas galinhas e nos pombos existam coccidios do genero *Eimeria,* estas aves não podem transmitir entre si tais parasitos.

Na U.R.S.S. frequentemente se confunde a coccidiose com a diarréia branca produzida pela *Salmonella pullorum.* De fato, muitas vezes a infestação pelos coccidios facilita a invasão do organismo, pela mucosa lesada do intestino, de varios bacterios, entre eles a *Salmonella pullorum,* que podem produzir lesões, por exemplo, no figado.

BRAGA e SOUZA (1930) dizem ter encontrado coccidios na clara do ovo. Admitem a possibilidade da invasão do ovo durante a travessia deste até a cloaca, mas WERNER, baseado em seus ensaios, nega essa possibilidade.

A coccidiose das galinhas é uma doença muito disseminada e de mui dificil combate. Já foram ensaiados varios medicamentos, mas nenhum de efeito seguro. Entre 1920-1930 KERR (Inglaterra) propoz o tratamento com leite iodado, que lhe pareceu ter dado bons resultados, os quais, entretanto, não foram confirmados. Os autores americanos muito recomendam o tratamento pelo leite (leite puro, leite em pó, coagulado, sôro de leite, lactose etc.). Este tratamento é baseado na opinião de que o leite diminue o pH no intestino. Porem, em 1933,

YAKIMOFF, GUCEV e RASTEGAEVA trataram, com leite, pintos, que morreram. YAKIMOFF e RASTEGAEVA obtiveram melhores resultados com o quinozol, que já fôra ensaiado com proveito por LUEHRS, em 1929 (soluto à 1:10.000 para beber).

Os autores russos citados obtiveram muito bons resultados com hextargan cujo soluto (1:5.000-10.000) foi usado como bebida.

Alguns autores até agora consideram identicos os coccidios de galinha e de algumas aves domesticas e selvagens. Porisso, no estudo dos coccidios das aves domesticas existe muita confusão. Assim, consideravam como a mesma as coccidioses de galinha, ganso, pato e perú. Mas, como veremos adiante, as coccidioses dessas aves são produzidas por coccidios diferentes.

### b) Gansos

RAILLET e LUCET (1890) descreveram um coccidio encontrado nos rins de ganso, e denominaram-no *Coccidium (Eimeria) truncatum*. Até 1933 esses coccidios foram considerados como os unicos que parasitam os gansos, mas nesse ano KOTLAN descreveu tres novos coccidios encontrados no intestino dessa ave: *Eimeria anseris, E. nocens* e *E. parvula*. Desse modo, foi afastada a hipotese da existencia de coccidios de galinha, no ganso.

A *E. truncatum* é oval com um dos polos truncados, com micropila, do tamanho de 18,0-26,0 X 16,0-20,0 μ, em media, 24,0 X 18,0 μ. Indice da forma 1:0,61-0,90, em media, 1:0,76. Estes coccidios foram descritos na França, Alemanha e Hungria. Na U.R.S.S. foram encontrados por YAKIMOFF na região de Pskov e em Azerbaidjan. Os rins das aves apresentam muitos pontos esbranquiçados, do tamanho da cabeça de um alfinete, constituidos por grande numero de coccidios.

Os coccidios do intestino, *E. anseris, E. nocens* e *E. parvula* foram encontrados por KOTLAN na Hungria. A *anseris*, parecida com a *truncata*, é piriforme, tem micropila, e mede 16,0-23,0 X 19,0-18,0 μ. A *nocens* é oval, tem micropila, e mede 25,0-30,0 X 17,0-24,0 μ. A *parvula* é esferica ou esfero-eliptica, sem micropila e mede 10,0-15,0 X 10,0-14,0 μ. Estes coccidios encontram-se na ultima porção do intestino delgado.

### c) Perús

Outrora tambem se supunha que os perús eram infestados pela *E. tenella*, da galinha, mas TYZZER (1929) provou que os perús têm dois coccidios que lhe são proprios: *Eimeria meleagriodis* e *E. meleagrimitis*.

Na U.R.S.S. até agora foi encontrado por YAKIMOFF e BUEVITCH, na região de Leningrado, somente a *E. meleagriodis*. A *E. meleagriodis*

é oval, de 19,4-29,7 X 14,52-23,1 μ, em media, 23,79 X 17,33 μ; a *E. meleagrimitis* é oval, de 16,5-20,46 X 13,2-17,23 μ, em media, 18,22 X 15,28 μ. A *E. meleagriodis* geralmente lesa o ceco, mas nos pintos tambem a ultima porção do intestino delgado e grande parte do intestino grosso.

2) Aves de caça.

a) *Tetrao tetrix* e *Tetrao urogallus.*

GALLI-VALERIO (1927) na Suissa e, em seguida, YAKIMOFF e GUCEV (1935) na Russia Branca, e YAKIMOFF e RASTEGAEVA (1937) na região de Leningrado, encontram no *T. tetrix* a *Eimeria lyruri.* Os oocistos são cilindricos e não têm corpo residual. Dimensões: 21,96-36,60 X 12,20-19,52 μ, media 29,62 X 15,32 μ. Indice da forma: 1:0,40-0,66, media 1:0,50. YAKIMOFF e GUCEV encontraram este coccidio tambem no *T. urogallus.*

Em 1935, YAKIMOFF e GUCEV encontraram no *T. tetrix* mais um coccidio, *E. nadsoni.* Oocistos esfericos e semiesfericos, de 19,52-25,64 μ. Corpos residuais somente nos esporocistos; granulo polar nos oocistos.

Finalmente, estes mesmos autores encontraram no *T. tetrix* a *Eimeria brumpti.* Oocistos esfericos e semiesfericos, de 19,52 μ. No oocisto não ha corpo residual nem granulo-polar.

GALLI-VALERIO atribue á coccidiose dos *T. tetrix* grande significação e a considera causa de grande mortalidade entre estas valiosas aves de caça.

b) Faizões

Foram encontrados coccidios nestas aves por MAC FADYEON, na Inglaterra, e por SJÖBRING, na Suecia. Estes autores identificaram esses coccidios aos da galinha, mas TYZZER (1929) provou que no faizão *(Phasianus colchicus)* existe uma especie distinta, por ele denominada *Eimeria phasiani.*

Os oocistos são elipticos, de 19,8-26,4 X 13,2-17,82 μ, em media 23,04 X 15,89 μ. Oocistos sem corpo residual mas com granulo polar. Encontram-se no intestino delgado e, ás vezes, nos cecos. Os fenomenos clinicos são identicos aos observados na galinha.

YAKIMOFF e MATCHULSKI (1937) descreveram, na U.R.S.S., um novo coccidio encontrado no *Phasianus chrysomelo,* que denominaram *Eimeria langeroni.* Os oocistos são ovais ou fusiformes, de 30,0-36,0 X 16,0-20,0 μ, em media 32,5 X 18,4 μ. Indice da forma 1:0,47-0,67, media 1:0,57. Corpo residual só nos esporocistos. Nos oocistos não a granulo polar.

c) Perdizes

FANTHAM (1910) na Inglaterra, e BRINKMAN (1926) na Noruega, encontraram coccidios em diversas especies de perdizes, porem a descrição desses parasitos não é exata. Assim, por exemplo, ALLEN (1934) acha que FANTHAM descreveu sob o nome de *Eimeria avium* duas ou mais especies diferentes. GALLI-VALERIO (1929), na Suissa, encontrou no intestino do *Lagopus mutus* oocistos cilindricos, semelhantes aos da *Eimeria lyruri*, do *T. tetrix*, de 25 X 15 μ. Estes coccidios são mais abundantes nas aves novas.

ALLEN (1934), nos EE. UU., examinou exemplares de *Lagopus lagopus*, *Bonassa umbellus* e *Canachites canadensis* e neles encontrou duas especies de coccidios: *Eimeria angusta* e *E. bonasae*. Os oocistos da *E. angusta* são elipticos, de 16,5-17,5 X 27,0-33,0 μ. Só os esporocistos têm corpo residual. Os oocistos da *E. bonasae* são esfericos, de 21 μ.

YAKIMOFF (1935), na U.R.S.S., descreveu no *Perdix cinerea* e na *Cacubis chucar* coccidios ovais e esfericos (mais raros). Os primeiros de 16,2-25,0 X 14,0-20,0 μ e os segundos de 17,6 μ. O autor denominou-os *Eimeria kofoidi*.

Devemos dizer que o estudo dos coccidios das perdizes ainda está muito confuso.

d) Galinha da serra

YAKIMOFF e BUEVITCH (1932) acharam coccidios numa galinha da serra, em Azerbaidjan. Oocistos cilindricos, ovais e esfericos, de 25,2-36,0 X 14,4-21,5 μ, em media 32,7 X 17,9 μ. Indice da forma 1:0,50-0,75, media 1:0,61. Os autores denominaram este coccidio *Eimeria transcaucasica*.

3) Aves selvagens

a) Pombos

LABBÉ (1896) descreveu um coccidio no pombo que anteriormente fôra observado por RIVOLTA e DELPRATO, na Italia, em 1871 e PFEIFFER, em Weimar. Este coccidio foi denominado por LABBÉ *Eimeria pfeifferi*, mas PINTO, em 1928, denominou-o *Eimeria labbéana* porque constatou que LABBÉ havia dado o nome de *pfeifferi* tambem ao coccidio do *Oniscus murarius*.

Os oocistos da *E. labbéana* são esfericos ou ligeiramente ovais. Os esfericos tem 15-20 μ e os ovais 17-20 X 13,5-17,0 μ. Somente os esporocistos têm corpo residual e os oocistos granulo polar. Este coccidio infesta varias especies de pombos, especialmente jovens, produzindo disturbios graves, acompanhados de diarréia.

NÖLLER e RUPPERT (1925) examinaram em Spandau 200 pombos-correios, dos quais 109 estavam infestados, sendo 20 fortemente. De 98 pombos de menos de um ano, 66 estavam infestados. YAKIMOFF e RASTEGAEVA (1929) e TIMOFEEV (1937) acharam pombos infestados em Leningrado e os dois primeiros autores, em Azerbaidjan (1931) e em Piatigorski (1934).

Alguns autores (HOFKAMP (1930) etc.) acreditam que os coccidios do pombo infestam a galinha. NIESCHULZ (1925), em 20 ensaios, só conseguiu infestar 2 pintos e estes mui fracamente. YAKIMOFF e IVANOVA-GOBZEM tentaram infestar galinhas com coccidios de pombo, e pombos com coccidios de galinha, mas os resultados foram negativos.

b) Grous

YAKIMOFF e MATCHULSKI (1936) descreveram duas especies de coccidios do *Grus virgo*. Uma delas é piriforme, com um polo alongado, mede 16,2-21,6 X 10,8-14,4 μ, em media, 19,3 X 12,0 μ. Indice da forma 1:0,50-0,80, media 1:0,63. Só os esporocistos têm corpo residual; os oocistos têm granulo polar. Os autores denominaram-no *Eimeria gruis*.

A outra especie é esferica ou ligeiramente oval e mede 14,4-23,4 X 12,6-13,0 μ, em media, 18,5 X 13,6 μ. Indice da forma 1:0,67-0,97, em media, 1:0,84. Os esporocistos têm corpo residual e os oocistos granulo polar. Os autores denominaram esta especie *Eimeria reichenovi*. Em 1937 ZOLOTAREV encontrou estas duas especies em Dagestan e denominou a primeira *Eimeria kazanskii* e a segunda *Eimeria nicolskii*. Estas denominações cáem em sinonimia com as de YAKIMOFF e MATCHULSKI.

c) Pavões

YAKIMOFF, GUCEV e MATIKACHVILI (1932), em Leningrado e Tachkent, encontraram duas especies de coccidios que eles consideram como *Eimeria tenella* e *Eimeria mitis*.

d) Pêgas

YAKIMOFF e GUCEV (1936) acharam na pêga (*Pica pica* L.) duas especies de coccidios do genero *Isospora*. Uma delas é semiesferica e mede 22,8-24,5 X 18,4-22,8 μ, em media, 23,9 X 19,9 μ. Indice da forma: 1:0,75-0,93, em media, 1:0,83. No oocisto e no esporocisto existem corpos residuais de grossos grãos. Os autores denominaram esta especie *Isospora rocha-limai*.

A outra especie é esferica e mede 19,8-25,9 μ, em media, 23,3 μ. Só os esporocistos têm corpo residual e os oocistos granulo polar. Os autores identificam esta especie á *Isospora lacazei* (?)

e) Picapau

YAKIMOFF e GUCEV (1936) encontraram numa especie de picapau *(Dryobotus major)*, a *Eimeria lyruri* e a *Eimeria brumpti*, acima descritas nos *Tetrao tetrix* e *Tetrao urogallus*.

f) *Coloeus monedula collaris*

YAKIMOFF e MATCHULSKI (1936) acharam nesta ave a *Isospora monedulae*, medindo 16-20 μ (oocistos esfericos) e 16-22 X 14-18 μ (ovais). Só os esporocistos têm corpos residuais e os cocistos granulo polar.

4) Aves de rapina

No estudo dos coccidios das aves de rapina existe grande confusão.

YAKIMOFF e MATIKACHVILI (1932) descreveram coccidios encontrados no *Bubo bubo*. Os oocistos são ovais ou elipticos, sem micropila nem operculo. Dimensões: 37-42 X 30-35 μ. Os esporos são esfericos e contem 8 esporozoitos e grande corpo residual. Na sua classificação foi afastado o genero *Caryospora* porque as especies deste genero parasitam os reptis. Baseado na rapida esporulação que é ás vezes observada no genero *Isospora*, em que ao envez de 2 forma-se apenas um esporo, os autores denominaram esse coccidio *Isospora henryi*.

ALLEN (1933), nos EE. UU., descreveu um coccidio no *Cathartes aura septentrionalis*. Oocistos semiesfericos medindo 33-35 X 28-30 μ. Um esporo com 8 esporozoitos. A autora creou para este coccidio um novo genero, *Eumonospora* (especie *E. tremula*).

HOARE (1934), na Inglaterra, numa publicação em que analisa o trabalho de ALLEN, compara todas as especies existentes de *Caryospora* com a *Eumonospora tremula* e chega á conclusão de que o *E. tremula* deve ser incluida no genero *Cariospora* e que o genero *Eumonospora* deve cair em sinonimia.

YAKIMOFF e MATCHULSKI (1936) descreveram um coccidio encontrado no *Tinnunculus tinnunculus*, no *Milvus* sp. e no *Bubo bubo*. Nestas tres especies de aves os oocistos são esfericos ou ovais e neles se desenvolve um esporo com 8 esporozoitos e um corpo residual. Dimensões (em geral): 30-45 X 28-39 μ. Comparando este coccidio com a *Isospora henryi* e com a *Caryospora (Eumonospora) tremula*, os autores chegaram á conclusão de que a *Isospora henryi* descrita por YAKIMOFF e MATIKACHVILI e a *Caryospora (Eumonospora) tremula* descrita por ALLEN são uma unica especie, isto é, *Caryospora henryi*

e, assim, a *Isospora henryi* e a *Caryospora (Eumonospora) tremula* cáem em sinonimia. Deste modo, o genero *Caryospora* existe não só nos reptis mas tambem em certas aves.

D. HENRY (1922), nos EE. UU., descreveu nos falcões *(Buteo swainsoni, B. borealis* e *Accipiter cooperii)* e na coruja *(Asio flammens)* a *Isospora bonteonis*, diferente da *Isospora lacazei*. Os oocistos da *I. bonteonis* têm forma irregular e medem 16,0-19,2 X 12,8-16,6 μ. A esporulação pode realisar-se no intestino da ave. Esporoblastos somente nos esporocistos.

YAKIMOFF e MATCHULSKI (1937) descreveram um novo coccidio no *Asio flammens leucopsis*, esferico, medindo 20-29 μ, em media, 22,17 μ, e outro oval, medindo 20-26 X 18-24 μ, em media, 23,1 X 20,9 μ. Indice da forma: 1:0,80-0,92, media 1:0,89. Corpo residual só nos esporocistos. Granulo polar, ás vezes duplo, no oocisto. Os autores denominaram este coccidio *Isospora strigis*.

5) Passaros.

Já dissemos que RIVOLTA, em 1873, encontrou em passaro o primeiro coccidio que, em 1878, denominou *Psorospermium avium*. LABBÉ, em 1893, descreveu o mesmo coccidio com o nome de *Diplospora lacazei* e *Diplospora rivoltae*. SJÖBRING, em 1897, descreveu esse coccidio nos pardais sob a denominação de *Isospora passerum*. Mas, em seguida, WASILEWSKI, em 1904, REICHENOW, em 1921 e CLAASSEN, em 1923, denominaram esse coccidio *Isospora lacazei*.

Damos a seguir uma lista dos passaros nos quais esse coccidio foi descrito por diversos autores.

*Corvus cornix* L. (LABBÉ SJÖBRING), *C. corone* L. (LABBÉ, VON WASIELEWSKI), *C. frugilegus* L. (VERWEY), *Sturnus vulgaris* L. (LABBÉ, VERWEY), *Oriolus oriolus* (L.) (LABBÉ), *Coccothraustes coccothraustes* (L.) (CONDORELLI E DE FIORI, 1892), *Chloris chloris* (L.), *Carduelis carduelis* (L.) (LABBÉ), *C. spinus* L. (RIVOLTA e DELPRATO, 1881, LABBÉ, CLAASSEN 1923), *C. cannibina* (L.) (LABBÉ, V. WASIELEWSKI), *Serinus canaris serinus* (L.) (V. WASIELEWKI), *Serinus canarius domesticus* (RIVOLTA e DELPRATO, PIANA, etc.), *Pyrrhula pyrrhula* (L.) (LABBÉ), *Fringilla coelebs* (L.) (LABBÉ, SJÖBRING), *Fr. montifringilla* L. (LABBÉ). *Passer domesticus* L. (EIMER, 1870, etc.) *Passer italiae* (VIEILL, RIVOLTA e DELPRATO), *Emberiza citrinella* L. (LABBÉ, SJÖBRING, V. WASIELEWSKI), *Emberiza hertulana* L.

(VERWEY), *Galerida cristata* (L.) (LABBÉ), *Alauda arvensis* L. (LABBÉ, LAVERAN, v. WASIELEWSKI e VERWEY), *Anthus pratensis* L. (LABBÉ), *Motacilla flava* L. (LABBÉ), *Motacilla alba* L. (LABBÉ, SJÖBRING), *Parus major* L. (v. WASIELEWSKI), *Parus coeruleus* L. (LABBÉ), *Lanius collurie* L. (SJÖBRING), *Muscicapa hypoleuca* PALL. (LABBÉ, e SJÖBRING), *Acrocephalus paludicola* (VIEILL, VERWEY), *Sylvia borin* BOOD (LABBÉ, v. WASIELEWSKI), *S. atricapilla* L. (RIVOLTA e DELPRATO, 1881, LABBÉ), *Sylvia* sp. (SJÖBRING), *Turdus pilaris* L., *T. philomelus* BREHM, *T. musicus* L. (VERWEY), *T. merula* L. (LABBÉ, VERWEY), *Oenanthe oenanthe* L. (LABBÉ), *Phoenicurus phoenicurus* L. (LABBÉ, SJÖBRING), *Luscinia megarhyncha* BREHM (RIVOLTA e DELPRATO, 1881 LABBÉ), *Erithacus rubecula* L. (LABBÉ), *Hirundo rustica* L., *Chelidon urbica* L. e *Riparia riparia* L. (LABBÉ).

Os oocistos deste coccidio são descritos como esfericos ou semi-esfericos, medindo 19-36 X 15-33 μ.

Duvidamos que todos esses oocistos sejam da mesma especie. Pesquisamo-lo em diversos passaros (*Passer domesticus, P. hispaniolensis, P. montanus, Sturnus vulgaris, Anthus trivialis, Chelidon rustica, Lynx torgnilla, Emberiza icterica, Fringilla coelebs, Crex crex* etc.).

Apezar de todos os coccidios de passaros terem sido classificados pelos diversos autores e por nós no genero *Isospora,* eles se distinguem entre si por determinados caracteres. Num pardal da Russia Branca existiam duas especies de *Isospora*: 1) oocisto oval ou eliptico, medindo 14,64-18,30 X 10,28-15,86 μ, em media, 16,48 X 13,04 μ. Indice da forma 1:0,64-0,92, em media, 1:0,79. Os oocistos esfericos medem de 12,2-14,69 μ e os semiesfericos 13,42-15,86 X 12,2-14,64 μ. 2) oocisto oval com polos aguçados, medindo 21,96-26,89 X 16,0-19,52 μ, em media, 23,84 X 17,4 μ. Indice da forma 1:0,63-0,83, em media, 1:0,72. E' indubitavel que estes dois coccidios pertencem a especies diferentes.

Os coccidios dos pardais de Leningrado são esfericos ou ovais; os primeiros medem 21,6-30,6 μ, em media, 26,3 μ, e os segundos 25,2-34,2 X 21,6-32,4 μ. Os coccidios dos pardais de Tadjikistan *(Passer montanus)* são esfericos e medem 22,5-27,0 μ, em media, 25,4 μ; os dos de Azerbaidjan são tambem esfericos e medem 21,6-32,4 μ.

Forma e dimensões de coccidios de outros passaros

| Nome dos passaros | Região | Forma | Dimensões |
|---|---|---|---|
| *Sturnus vulgaris* . . . | Leningrado | esferica | 18,5 - 26,6 μ, média, 22,1 μ |
| | Russia Branca | » | 21,6 - 24,4 μ |
| | Tadjikistan | » | 25,2 - 30,6 μ, média, 26,9 μ |
| *Motacilla* sp. . . . . . | Russia Branca | » | 21,6 - 28,8 μ, média, 24,4 μ |
| *Pyrrhula rubricilla* . . . | Tadjikistan | » | 32,4 - 39,6 μ, médio, 35,2 μ |
| *Anthus trivialis* . . . . | Russia Branca | » | 17,08 - 21,6 μ |
| *Lynx torgnilla*. . . . . | » » | » | 19,52 - 24,4 μ, média, 21,6 μ |
| *Pica pica* . . . . . . | » » | » | 10,3 - 24,0 μ, média, 21,56 μ |
| *Emberiza icterica*. . . . | Tadjikistan | » | 25,2 - 30,6 μ, média, 28,4 μ |

Vemos nesta tabela que são diferentes as dimensões das formas esfericas. Quando existem tambem formas semiesfericas e ovais, suas dimensões não são muito diferentes. Assim, por exemplo, na *Lynx torgnilla* da Russia Branca, as formas esfericas medem 19,52-24,4 μ, as semiesfericas 19,52-24,4-17,08-21,96 μ, e as ovais 21,96-28,06 X 18,30-23,18 μ.

Tanto quanto sabemos, nos diversos tipos da *Isospora lacazei* só os esporocistos têm corpos residuais; as vezes, porem, não se encontram tais corpos no esporocisto nem no oocisto. Em alguns casos os oocistos apresentam 1 ou 2 granulos polares. Estas circunstancias, parece, permitem-nos dividir esses coccidios do genero *Isospora* em diversas especies. Nos pardais e no *Sturnus vulgaris* ora existe, ora não, granulo polar. Na *Pica pica* existe sempre granulo polar. Alem disso, na *Pica pica* da região do Mar Negro existem dois coccidios bem diferentes: um com corpos residuais no oocisto e no esporocisto *(Isospora rocha-limai)* e outro com corpos residuais só nos esporocistos, mas com granulo polar nos oocistos (tipo da *Isospora lacazei*).

Alguns passaros são parasitados por coccidios de dois generos — *Eimeria* e *Isospora (Sturnus vulgaris)*. Alem disso, a forma dos esporos, a presença ou ausencia, neles, dos corpusculos de SCHNEIDER, tambem podem distinguir as diversas especies.

Vemos, pois, que ha nos passaros diversas especies de *Isospora*. Por exemplo, na *Pica pica* existe a *Isospora rocha-limai* e no *Corvus monedula* a *Isospora monedulae*. Classificá-las melhor é tarefa do

futuro. Para resolver definitivamente esta questão e separar os diversos coccidios é necessario fazer infestação crusada nas diversas aves.

Em relação a algumas aves estas questões já foram definitivamente resolvidas. Como dissemos acima, outrora se admitia que todas as aves domesticas eram parasitadas por um mesmo coccidio, a *Eimeria tenella*, da galinha. Verificou-se depois que a propria galinha domestica tem seis especies de coccidios, diferentes do ponto de vista morfo-imuno-biologico. O mesmo se constata em relação a outras aves (ganso, perú, faizão etc. ). Alem das formas diversas dos oocistos e dos esporos, das suas diferentes dimensões, da presença ou ausencia de corpos residuais nos oocistos e nos esporocistos, do granulo polar e dos corpusculos de SCHNEIDER nos esporocistos, a infestação heterogenea pelos coccidios constitue o melhor metodo para diferenciação das especies.

Outrora, a existencia de qualquer coccidio, nas fezes de um animal, parasito de outro animal, permitia supor que o primeiro se infestava com coccidio heterogeneo. Em rigor, porem, estes coccidios não são senão hospedes transitorios sem nenhuma dependencia desse animal. Nos trabalhos de TYZZER, SURCOUF, YAKIMOFF e colaboradores, ha muitos exemplos que o provam. Foi verificado que determinadas especies de coccidios só infestam animais do mesmo grupo (por exemplo os coccidios dos ovinos domesticos, infestam os selvagens; os dos cães e gatos infestam os leões, tigres, leopardos etc.). Ás vezes, porem, esses animais têm coccidios proprios, que não existem noutros animais do mesmo grupo (assim, o antilope persa é parasitado pela *Eimeria elegans*, o carneiro kirghiz pela *Eimeria arkhari*, o chacal pela *Isospora theileri* e *I. dutoiti)*.

Já exprimimos nossa suposição quanto á existencia de dois coccidios no pardal. Pelas experiencias de YAKIMOFF e seus colaboradores (IVANOVA-GOBZEM, GUCEV, BUEVITCH e MATCHULSKI), feitas em aves e mamiferos, ficou provado que os coccidios heterogeneos não infestam os animais. Entre outras provas, foi constatado, em relação ás aves, que com os coccidios da galinha não se póde infestar o pombo, e vice-versa, e com coccidios de grou não se consegue infestar a galinha.

Fizemos um curto resumo sobre os coccidios das aves. Os trabalhos futuros devem visar, alem das descrições dos novos coccidios, sua diferenciação.

Em todo caso, a teoria unitaria, que admite a existencia de um só coccidio e considera as especies como simples variedades, deve ser rejeitada.

## COCCIDII OF THE BIRDS IN U.R.S.S.

BY PROF. DR. V. L. YAKIMOFF

*Abstract*

*The author refers to the species of Eimeria, Isospora and Caryospora which have been found in the domestic and wild birds in U.R.S.S., and expresses the wish that a detailed study be made of the Coccidia infesting wild birds.*



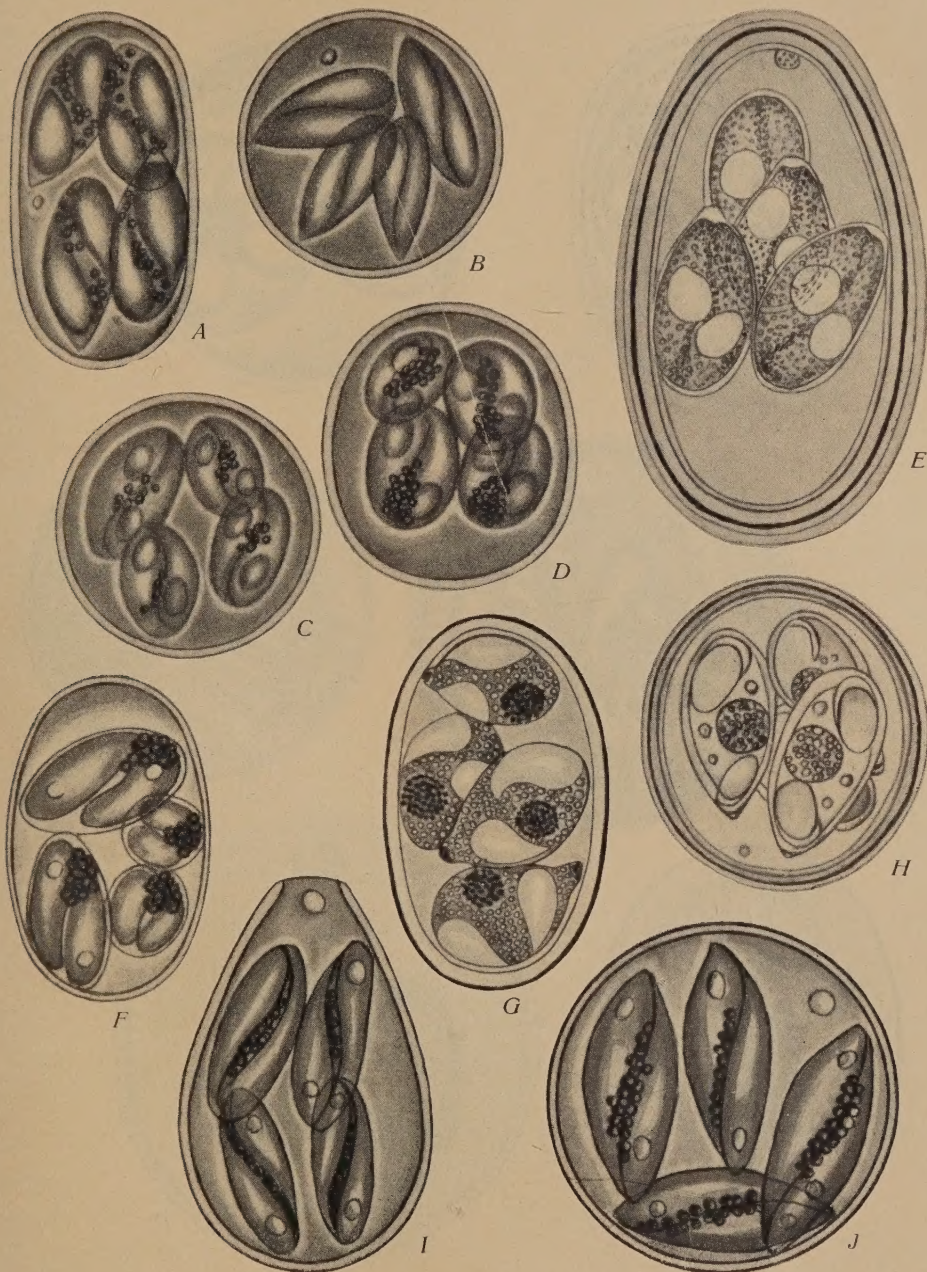



Fig. *A* - *Eimeria lyruri.* — Fig. *B* - *E. nadsoni.* — Figs. *C* e *D* - *E. brumpti.* — Fig. *E* - *E. angusta.* — Fig. *F* - *E. langeroni.* — Fig. *G* - *E. transcaucasica.* — Fig. *H* - *E. labbeana.* — Fig. *I* - *E. gruis.* — Fig. *J* - *E. reichenovi.*

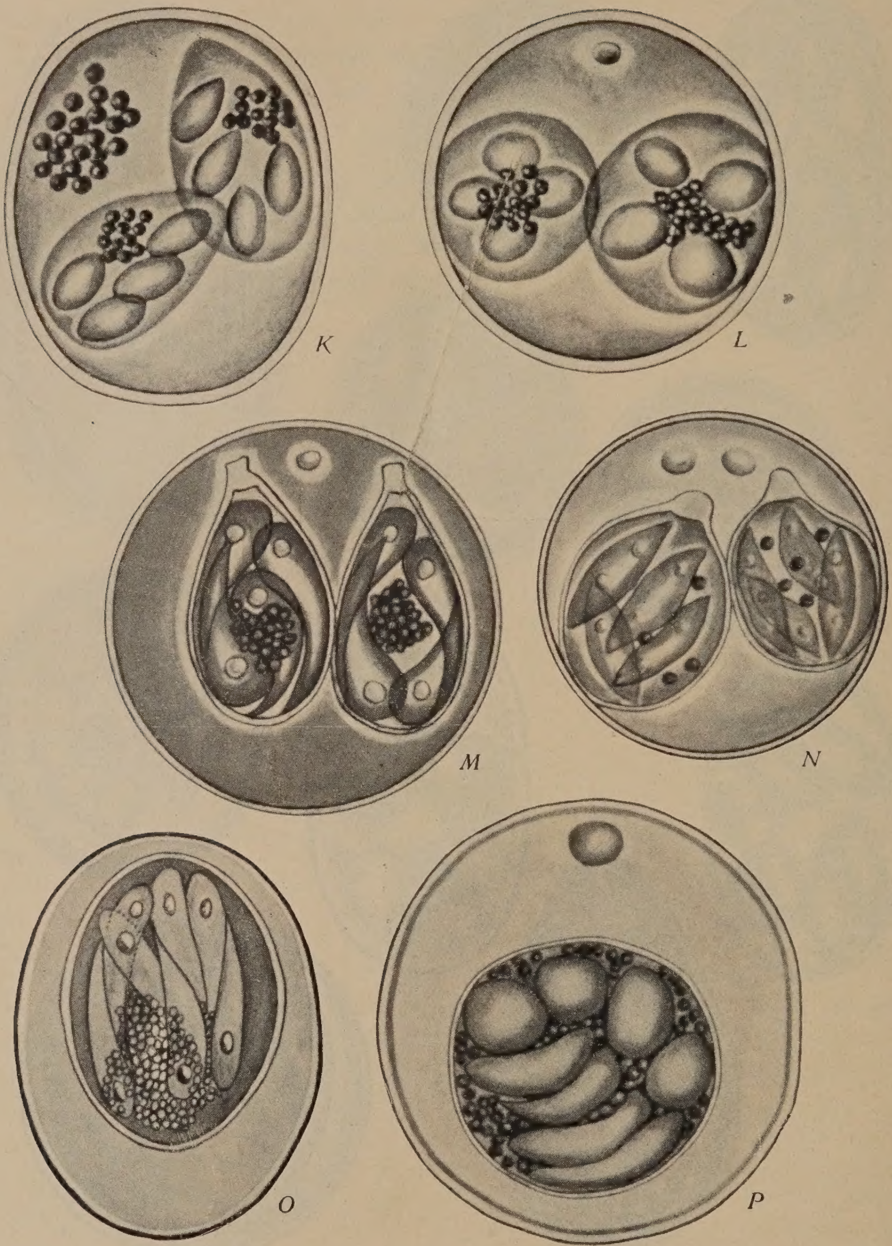



Fig. K - *Isospora rocha-limai.* — Fig. L - *I. lacazei* (?) — Fig. M - *I. monedulae.* — Fig. N - *I. strigis.* — Figs. O e P - *Caryospora henryi.*

SÃO PAULO
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
RUA 15 NOVEMBRO, 201
1940